

Zárójelentés
Amfifilikus polimerek és blokk-kopolimerek
szintézise és karakterizálása
62213 OTKA Pályázat

Debrecen, 2010

Tartalom

I. Egy új β -ciklodextrin konjugátum előállítása és önszerveződése	3
I.1. A konjugátum előállítása és karakterizálása	3
I.2. A PMe- β -CD konjugátum önszerveződése.....	6
II. Poliizobutilén-poli-vinil-alkohol blokk kopolimerek mint gyógyszerhordozó nanostruktúrák.....	10
2.1. A PIB-PVA kopolimerek előállítása és vizsgálata.....	10
2.2 Cmc és micella méret meghatározása	13
2.3. Statikus fényszórás mérések.....	14
2.4. Az aggregátumok dőpolása indometacinnal	15
III. A bisz(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén aggregációs tulajdonságának vizsgálata	19
IV. Az 1,6-ditio-D-mannitol polikondenzációja.....	24
4.2. A templáteffektus tanulmányozása	28
V. Neodol minták karakterizálása és önszerveződése	32
5.1. Neodol minták karakterizálása	32
5.2. Neodol minták önszerveződése	35
VI. Ciprofloxacín-Poli(etilén-glikol) konjugátum fragmentációs viselkedésének tanulmányozása.....	39
6.1. A ciprofloxacín-poli(etilén-glikol) konjugátum ESI-TOF MS vizsgálata	40
6.2. A ciprofloxacín-poli(etilén-glikol) konjugátum ESI-TOF MS/MS vizsgálata	41
VII. Szupramolekuláris guanozin alapú polimerek előállítása	44
VIII. A zárójelentés alapjául szolgáló közlemények listája:.....	49
Angol nyelvű közlemények.....	49
Konferenciakiadványok	50
A pályázat támogatásával megvalósult Ph.D. disszertációk.....	50
Magyar nyelvű előadások.....	52

I. Egy új β -ciklodextrin konjugátum előállítása és önszerveződése

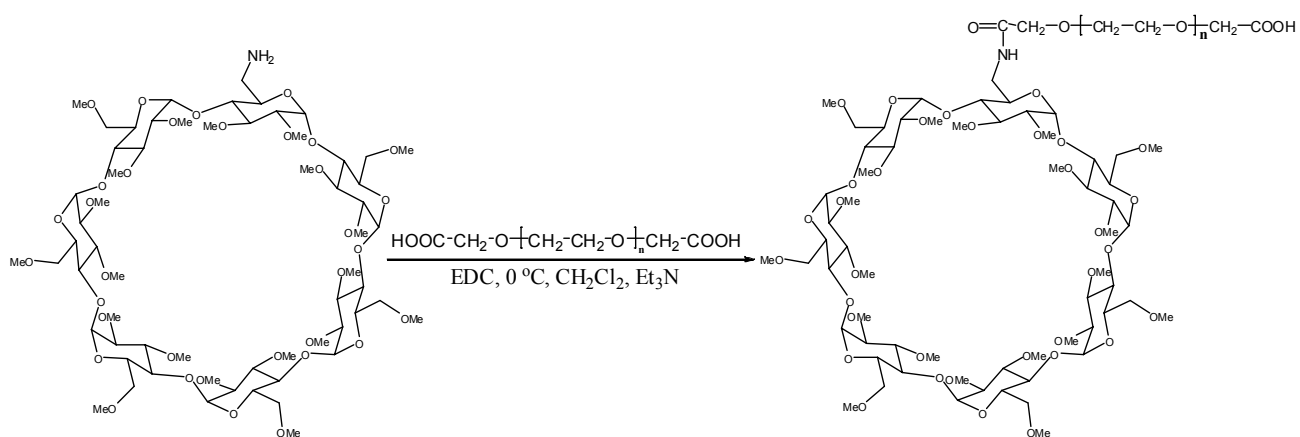
I.1. A konjugátum előállítása és karakterizálása

Munkánk során permetil-6-amino-6-deoxy- β -ciklodextrint (PMe- β -CD) polietilén-glikollal (PEG) kapcsoltunk össze és vizsgáltuk az önszerveződő tulajdonságát [1].

A ciklodextrinek egy nagyon fontos alosztályát alkotják az olyan nem kovalens ciklodextrin származékok, mint a rotaxánok. A ciklodextrinek és a poliéterek származékaiként jöhetnek létre rotaxán szerkezetek, a makrociklus üregén keresztül. A CD üregek viszonylag kötött mérete kisebb komplex képző képességéhez vezet. Ennek a nem kívánt tulajdonságnak elkerülésére a ciklodextrinekhez kovalens kötéssel polietilén és polipropilén-glikolok kapcsolhatóak, minek következtében egy olyan előnyös tulajdonságokkal rendelkező molekulát kapunk, melynek a makrociklus üregei szabadok és ez felhasználható pl. idegrendszerre ható gyógyszerhatóanyagok szállítására az agyba.

Jelen ismereteink alapján még senki nem állított elő ciklodextrin alapú amfifilikus polimer molekulát. A hidrofil polimer lánc és a módosított hidrofób ciklodextrin gyűrű kombinációjának legnagyobb előnye, hogy molekuláris szinten felüli szerkezeteket hoznak létre és ugyanakkor jó komplex képzők is egyben. A micella/vezikula magja dőpolható, függetlenül a ciklodextrin gyűrű üregétől ezért megteremti a lehetőségét új típusú multifunkcionális gyógyszerek előállításának.

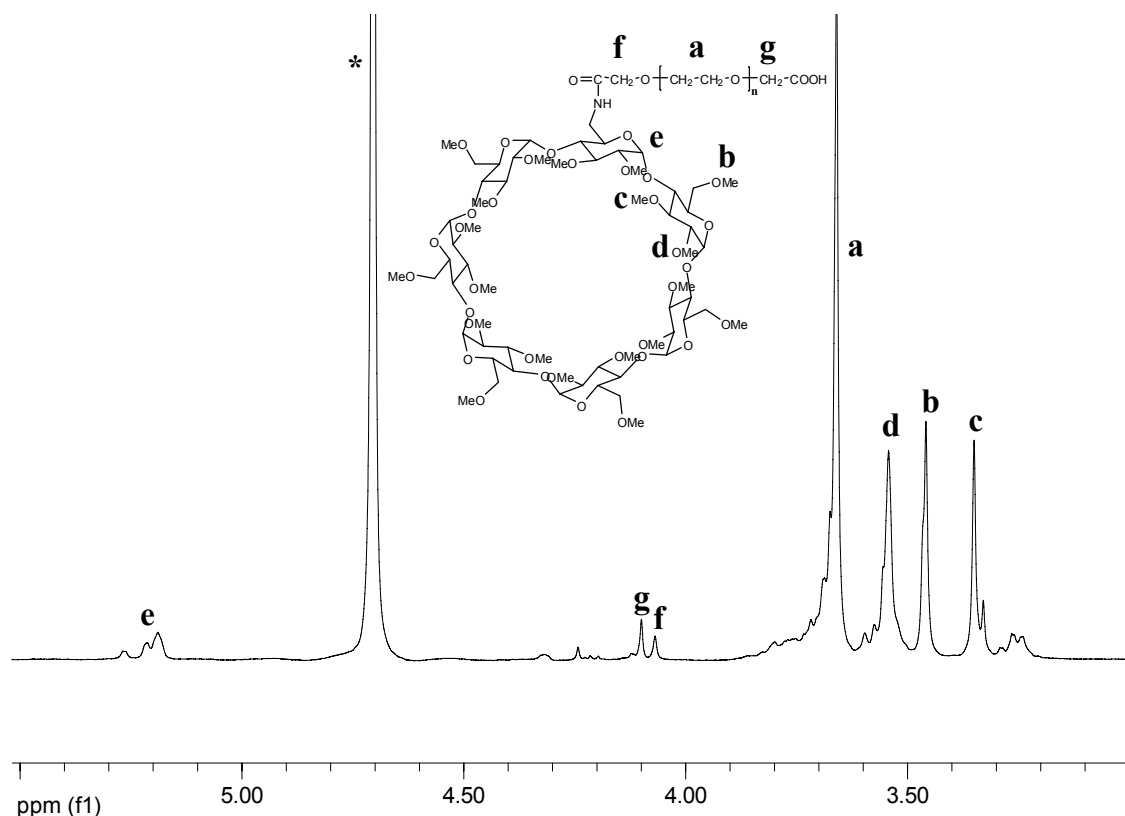
A PMe- β -CD-PEG molekulát az α,ω -dikarboxil-PEG és PMe- β -CD reakciójával állítottuk elő, melyet az 1. ábrán mutatunk be:



1. ábra

PMe- β -CD-PEG előállítása és a képződött termék szerkezete

A kapott késztermékünk tisztaságát méret kizorításos kromatográfiával (GPC-vel) ellenőriztük. A kromatogram mindössze egyetlen éles csúcsot tartalmazott, mely a tiszta késztermékünk volt. A késztermék szerkezetének az igazolására elkészítettük a minta ^1H -NMR spektrumát, amelyet a 2. ábra mutat be:

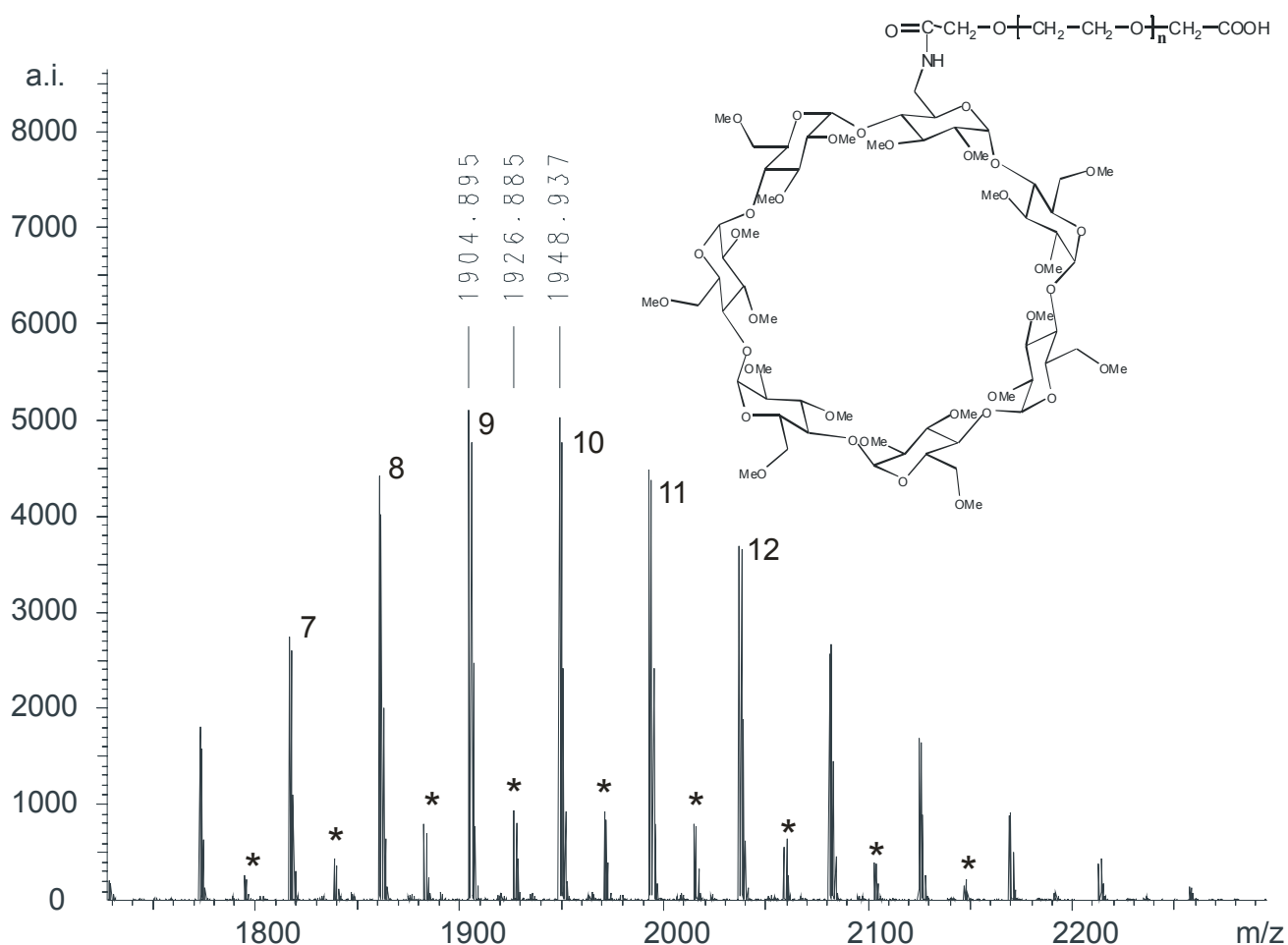


2. ábra

α,ω -dikarboxil-PEG-PMe- β -CD ^1H -NMR spektruma. A csillaggal jelzett nagy csúcs a jelen lévő vízhez tartozik.

($T=300\text{ K}$, $c=10\text{ mg/ml D}_2\text{O}$ oldószerben)

Azért, hogy kizárhassuk a lehetséges molekulán belüli zárvány komplexet és további információkat kaphassunk a szerkezetről, MALDI-TOF MS méréseket végeztünk. A MALDI-TOF MS spektrumot a 3. ábrán mutatjuk be:



3. ábra

α,ω -dikarboxil-PEG-PMe- β -CD MALDI-TOF MS reflektoron módban felvett spektruma. A csillaggal jelölt kis csúcsok a protonált molekulákból származnak, míg a fő csúcsok melletti számok a PEG lánc etilén-oxid csoportjainak a számát (n) jelölik.

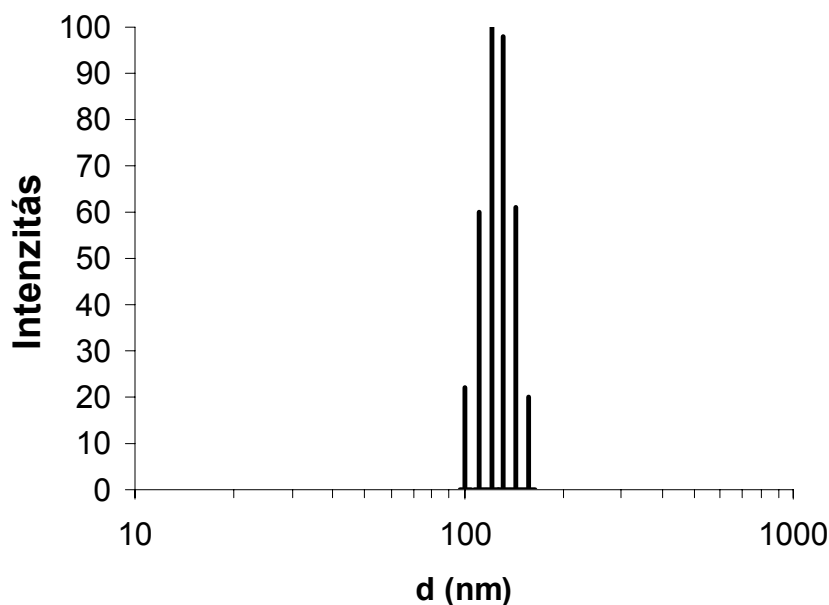
A MALDI-TOF MS spektrumban megjelenő tömeg sorozatokat (M) a következő összefüggéssel fejezhetjük ki:

$$M = M_{cat} + M_{végcsoport} + nM_r$$

Ahol M_{cat} a kation, $M_{végcsoport}$ a végcsoportok és M_r az ismétlődő egységek tömegét jelentik, n pedig a polimerizáció fokot. A fő csúcssorozatot a nátriummal kationizált terméként azonosítottuk, míg a kis csúcssorozatokat a protonált molekulákhoz tartoznak. A mért molekula tömegek megegyeztek a várt PMe- β -CD-PEG molekula tömegekkel.

I.2. A PMe- β -CD konjugátum önszerveződése

Ellentétben a kiindulási PMe- β -CD-el a termékünk jól oldódik vízben. Opálos oldatot kapunk, amely aggregátumok képződésére utal. A viszonylag kis PEG lánc elegendően nagynak mutatkozott ahhoz, hogy a nagy hidrofób cukor molekulát oldatba vigye. A vizes oldatban kialakuló aggregátumokat DLS mérésekkel vizsgáltuk. A méret eloszlásokat a 4. ábrán mutatjuk be:

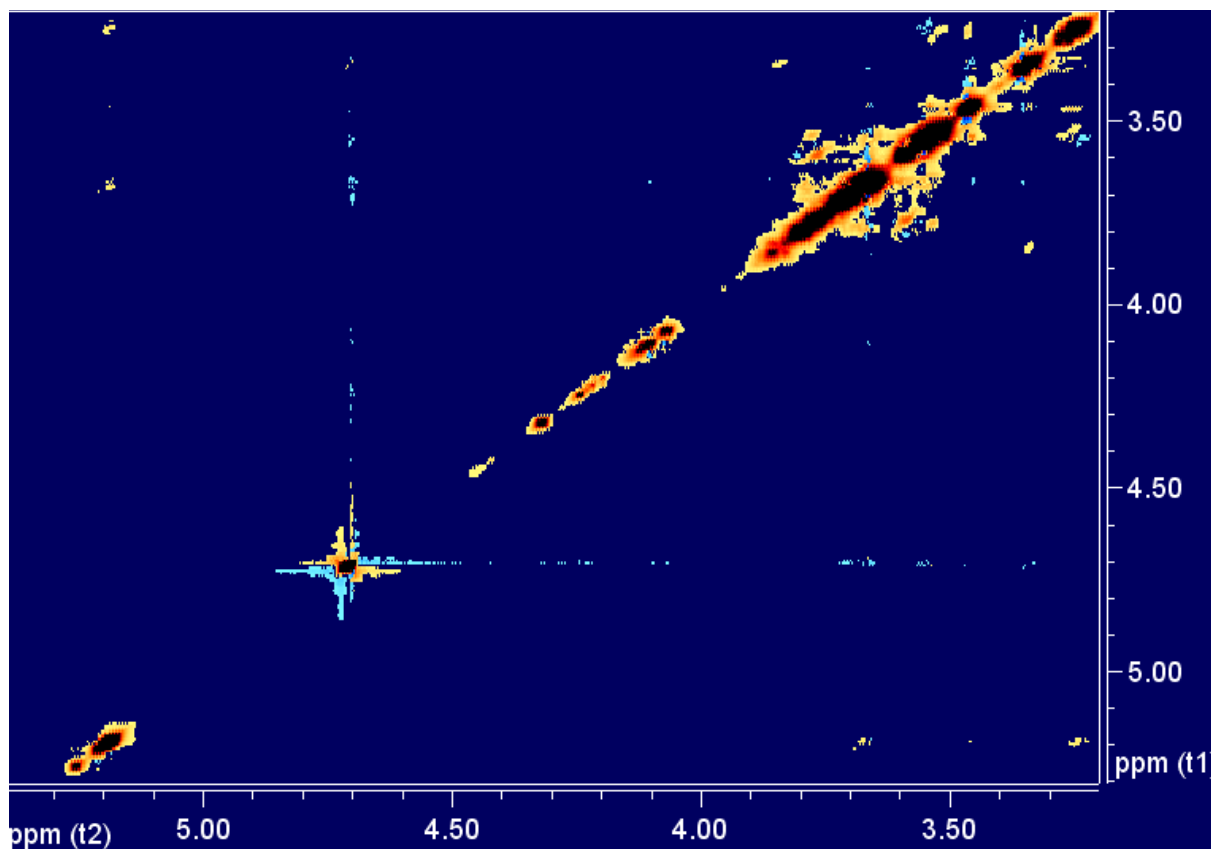


4. ábra

PMe- β -CD-PEG vízben képződött aggregátumok részecske méret eloszlása
($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c=10\text{ mg/ml}$, $\theta=90^{\circ}$, $d=\text{átmérő}$)

Ahogy az a 28. ábrából is látható viszonylag nagy aggregátumok képződtek, az átlagos micella átmérő 170 nm volt és szűk méreteloszlást mutatott. A legvalószínűbb micella szerkezet vízben, a CD egységek a micella belseje felé orientálódnak, míg a PEG részek az aggregátum külső részében foglalnak helyet.

A képződött aggregátumok még 1 nap elteltével is stabilak maradtak, amit a DLS méréseink igazoltak. A PMe- β -CD-PEG klasszikus amfifilikus polimerként viselkedik, ezért inkább micellák és/vagy vezikulák kialakulása várható mintsem belső komplex képződése a belső PMe- β -CD gyűrű és a PEG lánc között. Azért, hogy teljes egészében kizárhassuk ezt a lehetőséget 2D NOESY NMR vizsgálatot végeztünk. A spektrum egy kinagyított részét az 5. ábrán mutatjuk be.

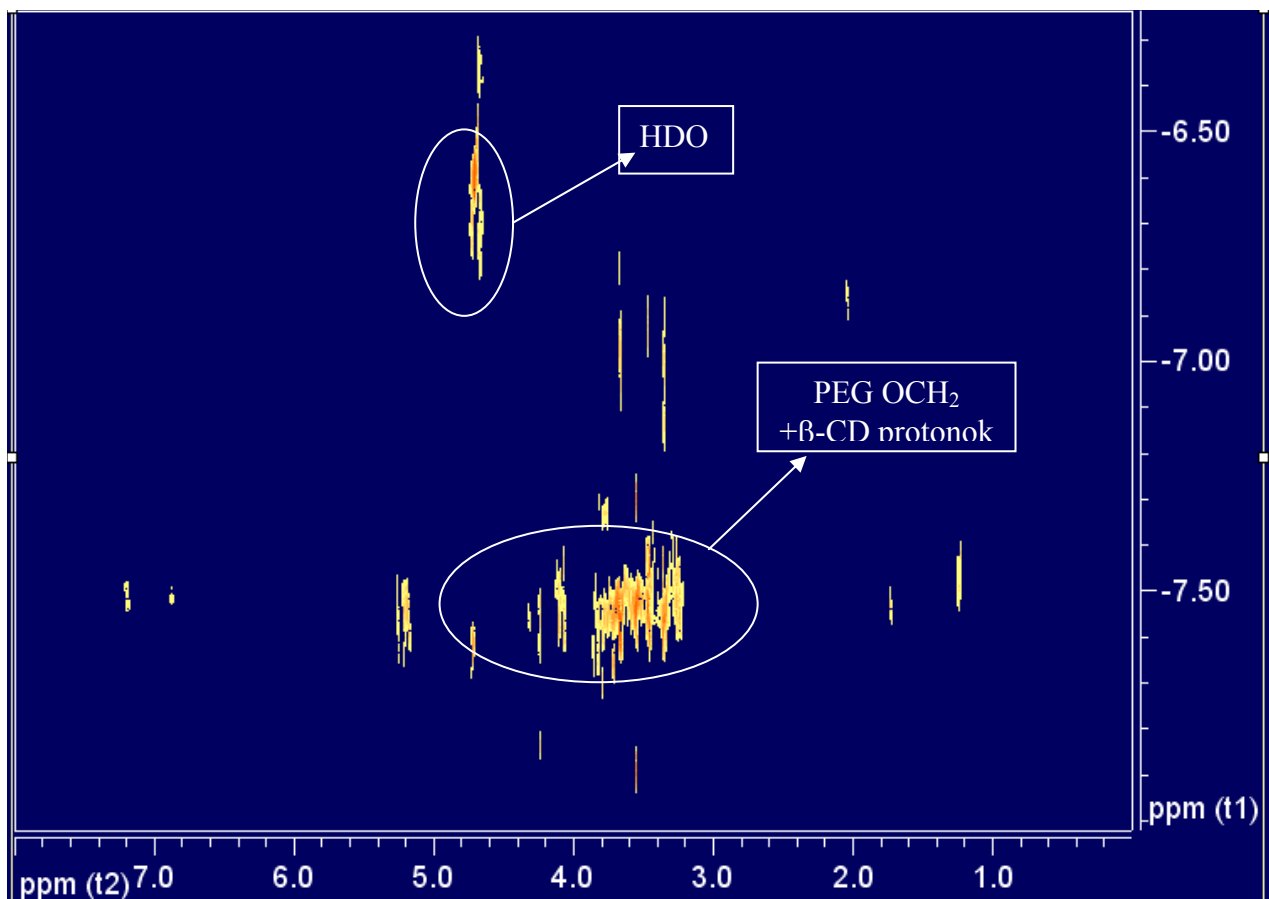


5. ábra

PMe-β-CD-PEG kinagyított NOESY NMR spektruma
(T=300 K, c=10 mg/ml D₂O-ben)

A spektrum alapján megállapítható, hogy nincsenek számottevő kereszt csúcsok a PEG fő lánc CH₂ protonjai (3,5 ppm) és a PMe-β-CD belső üreg protonjai között (5,2 ppm). Ez teljes mértékben összhangban van Harada eredményeivel, aki bizonyította, hogy nincs komplex képződés a PEG lánc és a nem módosított β-CD gyűrűk között¹⁰⁷. A PEG lánc a képződött aggregátum külső részében helyezkedik el, míg a PMe-β-CD gyűrűkön belül foglalnak helyet. Ha figyelembe vesszük, hogy a kapott vegyület vízzoldható és a PMe-β-CD ürege üres, akkor találhatóak olyan vízben nem oldódó molekulák, vagy gyógyszerhatóanyagok, melyek beleillenek az üregbe, így azok vizes oldatba vihetők.

Fontos, hogy ismerjük a képződött aggregátum tömegét és aggregációs számát is, ezért a PMe-β-CD-PEG-et D₂O-ben oldottuk és az oldatot 2D DOSY NMR módszerrel vizsgáltuk. A kapott spektrumot a 6. ábrán mutatjuk be:



6. ábra

PMe-β-CD-PEG 2D DOSY spektruma nehézvízben
(HDO; T=300 K c=10 mg/ml D₂O-ben)

A DOSY NMR technika sikeresen alkalmazható különböző keverékek vizsgálatára, aggregátumok karakterizálására és intermolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára. A 30. ábra a mérés során kapott 1D spektrumok inverz Laplace transzformációját mutatja. Az azonos sorban lévő jelek diffúziós konstansa azonos, ezért azonos molekula tömeghez tartoznak. A molekulatömeg egyszerűen számolható a főlánc CH₂ lecsengési jelére illesztett exponenciális görbéből az (1) és (2) egyenlet alapján:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_{hs}} \quad (1)$$

Ahol D a diffúziós koefficiens és T a hőmérséklet.

$$\frac{M_1}{M_{ref}} = \left(\frac{D_{ref}}{D_1} \right)^3 \quad (2)$$

Ahol k a Boltzman állandó, η az oldószer viszkozitása; r_{hs} a molekula hidrodinamikai átmérője; M_1 a molekula tömege; M_{ref} belső referencia vegyület tömege. D_1 és D_{ref} az

aggregátum és a referencia vegyület diffúzió koefficiense. Gömb alakot feltételeztünk és nehézvizet használtunk referencia molekulának. Az aggregátumra kapott eredményeink alapján egy molekula tömege megközelítőleg 20 kDa (egy 0,1 ppm növekedés a 6. ábra függőleges tengelyén egyenlő egy kétszeres molekulatömeg növekedéssel). Ez az érték alatta van, annak az értéknek, amit a fényszórás mérések alapján vártunk. Erre egy egyszerű magyarázat lehet: az aggregátumok anizotrópikus diffúziója. A DOSY technika csak egy függőleges gradienst használ és jó eredményeket csak gömb alakú molekulák esetén ad. Figyelembe kell vennünk, hogy a CD gyűrű sokkal nagyobb, mint a PEG lánc ezért arra következtethetünk, hogy a vizes közegben az aggregátumok megnyúlt szerkezetűek, ahol a CD gyűrűk egymás mellé rendeződnek, így egy hosszú hidrofób láncot alkotva, ezzel szemben a PEG láncok merőleges irányban a hidrofil közeg felé orientálódhatnak, ezzel hidrofil oldalláncokat létrehozva. A CD gyűrűk láncokat hozhatnak létre és megfelelő polimer láncsal olyan flexibilis amfifilikus graft kopolimert nyerhetünk, melyben PEG láncok rotációja szabad a CD lánc körül.

A fenti elméletünk alátámasztására és, hogy bizonyítsuk az amfifilikus rotaxánok képződését, poli-propilén-glikolt ($M_n = 1000$ Da) adtunk a PMe- β -CD-PEG vizes oldatához, és az eredmény azonnali fehér csapadékkiválás volt, mely egyértelműen a rotaxánok képződésének a következménye.

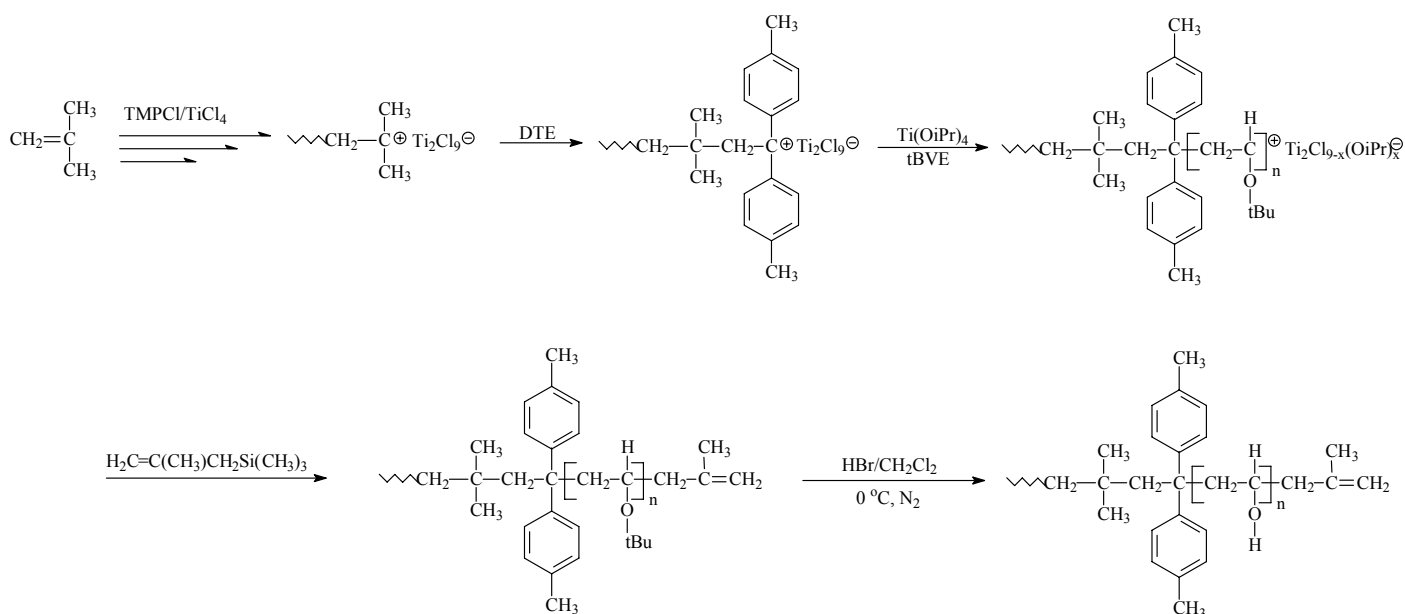
II. Poliizobutilén-poli-vinil-alkohol blokk kopolimerek mint gyógyszerhordozó nanostruktúrák

2.1. A PIB-PVA kopolimerek előállítása és vizsgálata

A poli-vinil-alkoholok (PVA) a gyógyszeriparban széles körben alkalmazott adalékanyagok poláris természetük miatt. Egy olyan blokk kopolimer, mely tartalmaz egy poláris PVA láncot, valamint egy apoláris poli-izobutlén (PIB) részt vizes közegben aggregátumokat képez, és ez akár gyógyszerhatóanyag „szállítására” is felhasználható. Munkánk során poliizobutilén-polivinil-alkohol (PIB-b-PVA) blokk-kopolimereket állítottunk elő, és - lehetséges biológiai alkalmazások miatt - az aggregációs tulajdonságaikat vizsgáltuk vizes közegben, majd karakterizálás után Indometacinnal dópoltuk, és vizsgáltuk a micellaméret változásait, valamint a micellába bevihető Indometacin mennyiségét és azt, hogy ez hogyan változik a hidrofil PVA lánc hosszával állandó hosszúságú PIB rész mellett [2].

A vizsgálatainkhoz PIB-b-PVA amfilikus blokk kopolimert szintetizáltunk, az apoláris PIB lánc hossza valamennyi esetben azonos, de a poláris PVA lánc hossza különböző volt. Polivinil-alkoholt nem lehet egyszerű polimerizációval előállítani, ezért a szintézis első lépésében poliizobutilén-blokk-poli-terc-butil-vinil-étert (PIB-b-PtBVE) állítottunk elő, majd a PIB-b-PtBVE hidrogén-bromidos hidrolízisével állítottuk elő PIB-b-PVA-t.

A teljes szintézist a 7. ábra összefoglalva mutatja be:



7. ábra

A PIB-b-PVA kopolimerek előállítása

A molekula tömegeket és a PIB-b-PtBVE minták molekula tömeg eloszlásait mind GPC-vel mind ^1H -NMR módszerrel meghatároztuk. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

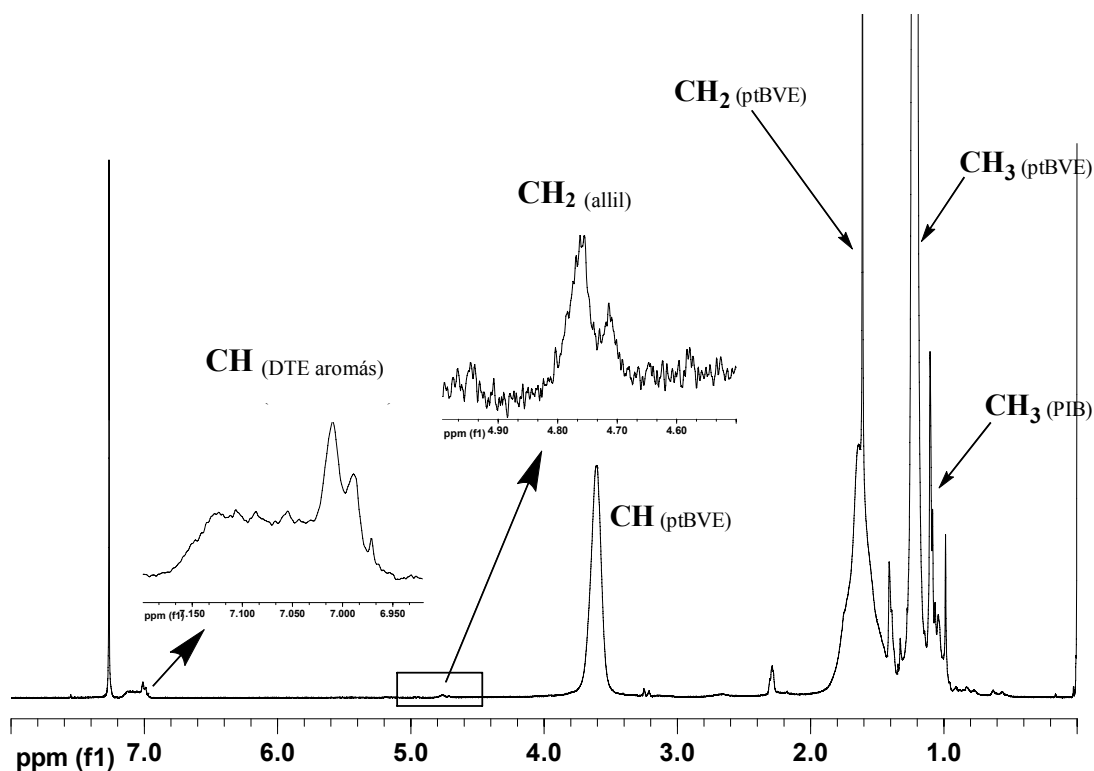
1. táblázat

Szintetizált poliizobutilén-terc-butil-vinil-éter polimerek molekula tömege és molekula tömeg eloszlása.

Minta jele	M_n (GPC) (g/mol)	M_n (^1H -NMR) (g/mol)	PD
PIB	900	750	1.19
PIB-b-PtBVE1	5300	5800	1.10
PIB-b-PtBVE2	11700	13000	1.08
PIB-b-PtBVE3	17400	18000	1.08
PIB-b-PtBVE4	25800	24000	1.11

A különböző módszerekkel meghatározott molekulatömegek jó egyezést mutattak.

Az ^1H -NMR-rel meghatározott molekulatömegek problémáját a 8. ábrán mutatjuk be.



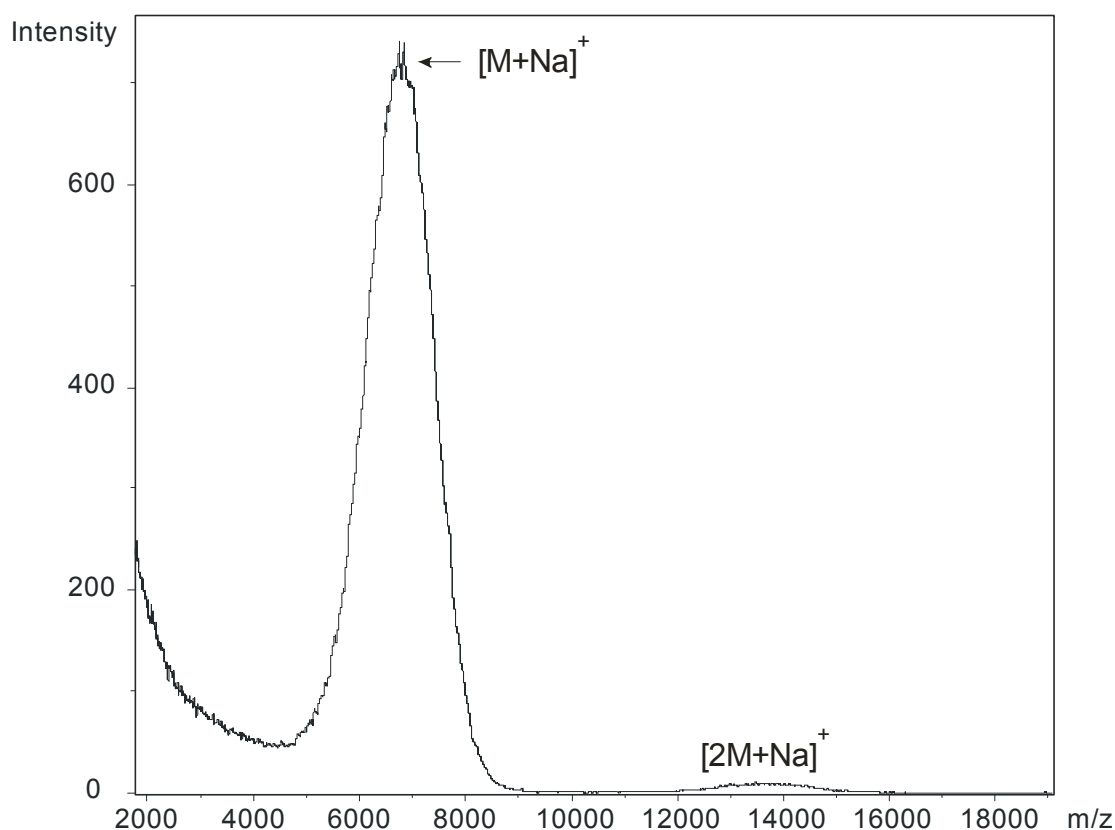
8. ábra

PIB-b-PtBVE jellegzetes ^1H -NMR spektruma
(Oldószer: CDCl_3 , $T=298\text{K}$, belső standard: TMS)

A legfőbb probléma, hogy a PIB és a PtBVE részek fő láncainak proton jelei átlapolnak, ezért a számításainkat az aromás DTE protonok és a BVE metilidén (CH) protonjainak a jelintenzitásainak az aránya alapján végeztük.

A tBVE csoportok átalakítását PVA csoportokká HBr-dal végeztük, diklór-metánban. A tBVE csoportok eltávolítása jelentős molekula tömeg csökkenéssel járt. A szintetizált PIB-b-PVA polimer csak poláris oldószerekben oldható, mint pl. víz, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid és dimetil-acetamid. Mivel THF-ban nem oldódott, ezért a molekula tömeget GPC-vel nem tudtuk meghatározni. A PIB protonok és a PVA metilén protonok jeleinek teljes átlapolása miatt $^1\text{H-NMR}$ -rel molekulatömeg meghatározása nem lehetséges:

A fent felsorolt problémák miatt a szintetizált polimerek pontos molekula tömegét MALDI-TOF MS-val határoztuk meg (9. ábra).



9. ábra

A PIB-b-PVA2 kopolimer lineáris módban felvett MALDI-TOF MS spektruma.

A polimerek mért és számított molekula tömegeit a 2. táblázatban foglaltuk össze:

2. táblázat
Előállított Poliizobutilén-poli-vinil-alkohol minták molekula tömegei.

Minta	M _n (számolt) (g/mol)	M _n (MALDI) (g/mol)
PIB-b-PVA1	2950	3250
PIB-b-PVA2	5800	6500
PIB-b-PVA3	8350	9500
PIB-b-PVA4	12000	14500

A számított és mért molekula tömegek jó egyezést mutattak rövid PVA láncok esetén, de a különbség a PVA lánc hosszával nőtt. A számolt molekula tömegek tartalmazták a GPC mérés hibáit, a MALDI viszont abszolút módszer a molekula tömeg meghatározásra azért a további vizsgálatainkhoz a MALDI-TOF MS-sel meghatározott molekula tömegeket használtuk.

2.2 Cmc és micella méret meghatározása

A PIB-b-PVA kopolimerek egyik lehetséges alkalmazási területe az orvostudomány, ahol mint gyógyszerhatóanyag hordozók segítheti a hatóanyagok célbajuttatását az élő szervezetben. Vizes oldatukat két módszerrel állítottuk elő, majd fényszórás fotometriával vizsgáltuk. A polimerek vízben oldódnak, ezért az első oldatsorozatot közvetlen oldással készítettük, a második oldatsorozat esetén a polimereket N,N-dimetil-acetamidban oldottuk, majd desztillált vízben 1 hétig dializáltuk. Mindkét sorozat esetén a tervezett koncentrációra hígítottuk a törzsoldatokat, 24 órán keresztül hagytuk az egyensúlyt beállni, majd mérés előtt szűrtük. A dinamikus fényszórás mérésekkel kapott eredményeket, a kritikus micellaképződési koncentrációt és az effektív micella átmérőt a 3. táblázatban foglaltuk össze:

3. táblázat
PIB-b-PVA kopolimerek vizes oldatainak DLS mérésekkel meghatározott micelláris paraméterei.

Kopolimerek	Közvetlen oldással			Dializálva		
	cmc (mg/mL)	Cmc (mmol/mL)	Micella méret (nm)	cmc (mg/mL)	cmc (mmol/mL)	Micella méret (nm)
PIB-b-PVA1	0.045	1.38E-5	185	0.056	1.72E-5	180
PIB-b-PVA2	0.056	8.61E-6	180	0.071	1.09E-5	130
PIB-b-PVA3	0.061	6.42E-6	165	0.100	1.05E-5	105
PIB-b-PVA4	-	-	-	0.120	8.27E-6	85

Az eredményekből látható, hogy a közvetlen oldással készített oldatsorozat esetén a cmc értékek kisebbek lettek, mint a dializált oldatsorozaté. Ennek egy lehetséges magyarázata lehet, hogy szilárd fázisban a PVA láncok erős hidrogén kötésekkel kapcsolódnak össze, és az aggregátumoknak külső része felé orientálódnak a PIB-láncok, ezért a víz nehezen éri el a szilárd kopolimer aggregátum belsejét, így ahelyett, hogy a víz beoldaná a polimert, nagyobb kopolimer aggregátumok lesznek jelen a vizes fázisban. Ez a hatás fokozottabban jelentkezett a PVA lánc növekedésével. A PIB-b-PVA4 minta esetében fényszórást nem tapasztaltunk miután a mintát 1 μm -es membránszűrőn szűrtük. A kevésbé poláris oldószer mindkét részt oldja, ezért dialízises módszerrel megfelelő oldat készíthető. A táblázat adataiból jól látszik, hogy a cmc értéke a PVA lánc csökkenésével csökkent, ami a várakozásainknak megfelelő, hiszen a tenzidek apolárosságának a növekedésével a cmc értékek csökkennek.

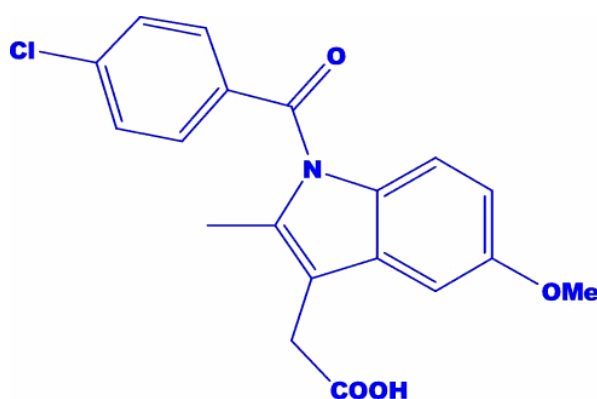
2.3. Statikus fényszórás mérések

Az SLS mérések is igazolták, hogy a micella mérete csökkent a molekula tömeg növekedésével. Alacsonyabb molekulatömegű kopolimerek esetén az apoláris (PIB) és a poláris (PVA) részek közel azonosak, ezért a legvalószínűbb, hogy nagy aggregációs számú gömb alakú (mag-héj) micellákat képeznek. A hidrodinamikai átmérő (R_h) csak kis mértékben különbözik a forgási átmérőtől (R_g). Az R_g/R_h hányados értékéből következtethetünk a micella alakjára. Gömbalakú micellákra ez a hányados 0,8-1,3 tartományba esik. Mivel a mi általunk meghatározott hányadosok a molekula tömeggel nem változtak jelentősen (0,78-0,93) és beleestek a fenti tartományba, ezért gömbalakú micellákat feltételezhetünk. Habár az R_g/R_h hányados a PIB-b-PVA1 minta is gömbmicella képződésére utal, de a nagy aggregációs szám miatt ($N_{\text{Agg}} > 10^4$) a klasszikus mag-héj micella kialakulása valószínűtlen és a képződött aggregátumok nagy valószínűséggel vezikulák.

Amennyiben a poláris rész nagysága többszöröse az apoláris rész, nagyságának az aggregációs szám nagymértékben lecsökken, amely az erős PVA-víz kölcsönhatással párosulva kisebb micella méretet eredményez. A PIB-b-PVA4 minta esetében az $R_g/R_h = 0,78$, ami majdnem egyenlő az elméleti homogén gömbmicellákat tartalmazó rendszerre vonatkozó 0,775 értékkel, bár a micellák mérete és az aggregációs száma a vártnál nagyobb.

2.4. Az aggregátumok dópolása indometacinnal

A kopolimerek vízben képződött aggregátumai egy apoláris maggal rendelkeznek, amelyek felhasználhatóak apoláris gyógyszerhatóanyagok szállítására. Egy tökéletes példa apoláris gyógyszerhatóanyag molekulára az Indometacin (10. ábra), amely vízben gyakorlatilag nem oldódik. Az Indometacin (INN) vagy Indomethacin (USAN) egy nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszer, melyet láz, izommerevség, duzzanatok kezelésére használnak. Ezeket a tüneteket, a prosztaglandin-szintézis gátlásával csökkenti.



10. ábra
Indometacin szerkezeti képlete

A telített Indometacin oldat koncentrációjának a meghatározása nehéz, az irodalomban is különböző adatokat találunk. Mi UV-VIS spektroszkópiát választottuk a koncentráció meghatározására. Az Indometacint etanol/víz=3/1 (v/v) oldószerkeverékben oldottuk, a megfelelő koncentrációra hígítottuk, majd az oldatsorozatot UV-VIS spektrométeren mértük. Az abszorbancia maximum 321 nm-nél volt, ezen a hullámhosszon mért abszorbancia értékeket ábrázoltuk a koncentráció függvényében. Ezt a kalibrációs egyenest használtuk a további kísérleteink során, az Indometacin koncentrációjának a meghatározására a különböző kopolimer oldatokban.

A kopolimer mintákat és az Indometacint N,N-dimetil-acetamidban oldottuk, 1 hétig desztillált vízben dializáltuk. A dialízis végén a vizes oldatot szűrtük, majd UV-VIS spektrofotométerrel vizsgáltuk.

Azért, hogy a mérés során az esetlegesen fellépő fényszórás hatását kiküszöböljük, Indometacin nélküli PIB-b-PVA kopolimer oldatokat is dializáltunk azonos körülmények között, majd a két spektrumot kivontuk egymásból. Így, a különbség spektrum 321 nm-nél mért abszorbancia érték tisztán az Indometacinból származott.

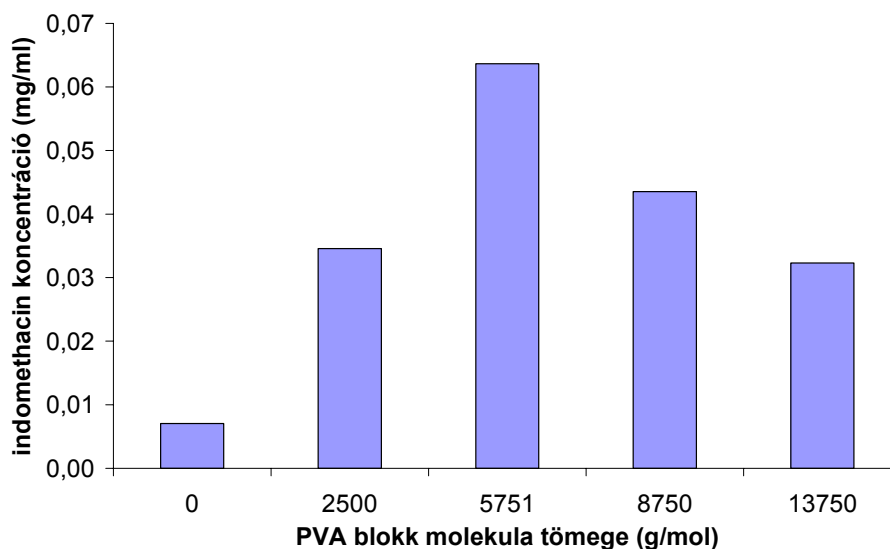
A spektrumoknál ellenőriztük az esetlegesen visszamaradt N,N-dimetil-acetamidból származó csúcsokat, de az oldószerre jellemző sávok teljes egészében hiányoztak a spektrumból.

Az abszorbanciákat valamennyi esetben 321 nm-en mértük, és az Indometacin koncentrációját a kalibráló egyenes alapján határoztuk meg. Az abszorbancia értékek alapján számított Indometacin koncentrációkat a 4. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat
Indometacin oldhatósága a kopolimer oldatokban vizes közegben 25°C-on

	Molekula tömeg (g/mol)	Polimer koncentráció (mg/mL)	Polimer koncentráció (mmol/mL)	Indometacin oldhatósága (mg/mL)
Vízben közvetlen oldással		0	0	0,0038
Víz		0	0	0,0071
PIB-b-PVA1	3250	5,76	0,0018	0,0167
PIB-b-PVA2	6500	7,04	0,0011	0,0494
PIB-b-PVA3	9500	8,17	0,0009	0,0248
PIB-b-PVA4	14500	11,34	0,0008	0,0265

Valamennyi kopolimer oldatban növekedett az Indometacin oldhatósága. Az oldhatóság legnagyobb mértékben a PIB-b-PVA2 kopolimer esetén nőtt, ebben az esetben az Indometacin oldhatósága több mint tízszeresére növekedett a tiszta vízhez képest, bár a növekedés nem lineáris. Azért, hogy az Indometacin oldhatóságát jobban össze tudjuk hasonlítani, a PIB-b-PVA1 koncentrációjára (5,76 mg/ml) hígítottuk valamennyi oldatot. Azonos polimer koncentráció esetén mért Indometacin oldhatóságokat a 11. ábrán mutatjuk be.



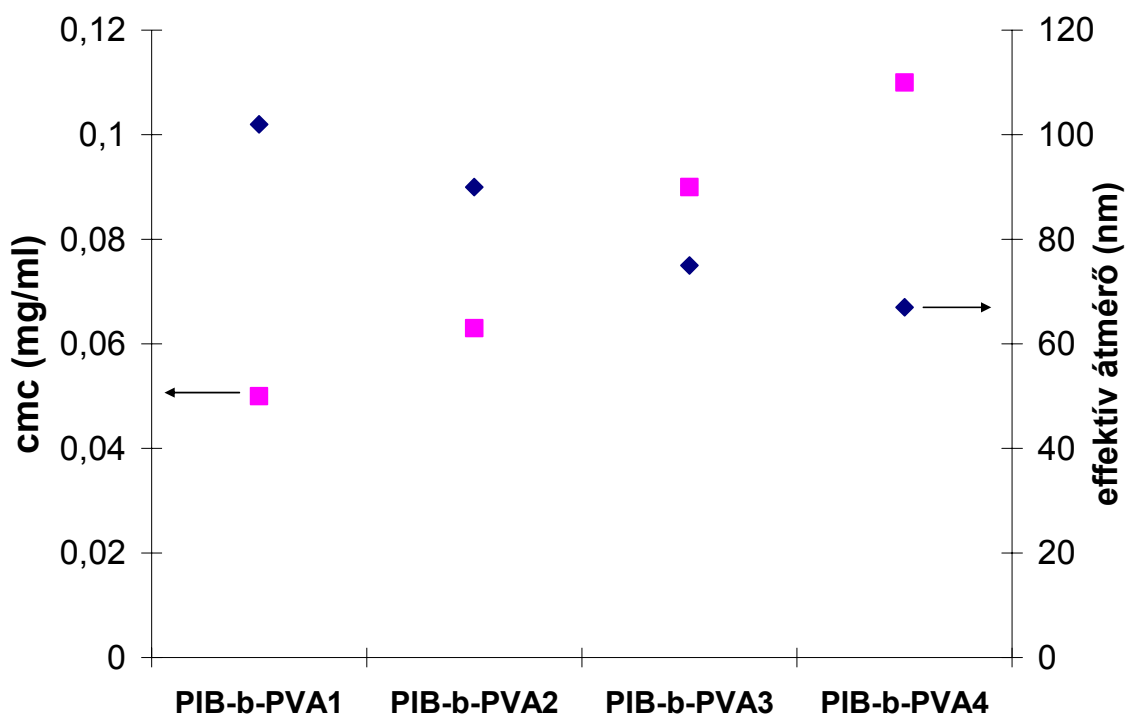
11. ábra

Telített Indometacin oldat koncentrációja a PVA rész hosszának a függvényében.

Ahogy az a 11. ábrán jól látható, azonos polimer koncentrációk esetén is a PIB-b-PVA2 kopolimer vizes oldatában a legnagyobb az Indometacin oldhatósága, ami majdnem kétszeres oldékonyságot jelent a többi kopolimerrel összehasonlítva. Ez a jelenség a kopolimer micellák tulajdonságaival magyarázható.

Rövid PVA lánc esetén (PIB-b-PVA1) nagy aggregációs számú micellák képződnek, ami alacsony micella koncentrációt eredményez és ezzel együtt az apoláris üregek koncentrációja is kicsi. Ezzel ellentétben, hosszú PVA láncok esetén (PIB-b-PVA4), az aggregációs szám jelentős mértékben lecsökken, de a molekula tömeg nagymértékű növekedése miatt a kopolimer egységnyi tömegére számított micella koncentráció alacsonyabb, mint közepes méretű PVA láncokat tartalmazó (PIB-b-PVA2 és 3) polimerek esetén, ami a 11. ábrán egyértelműen látható.

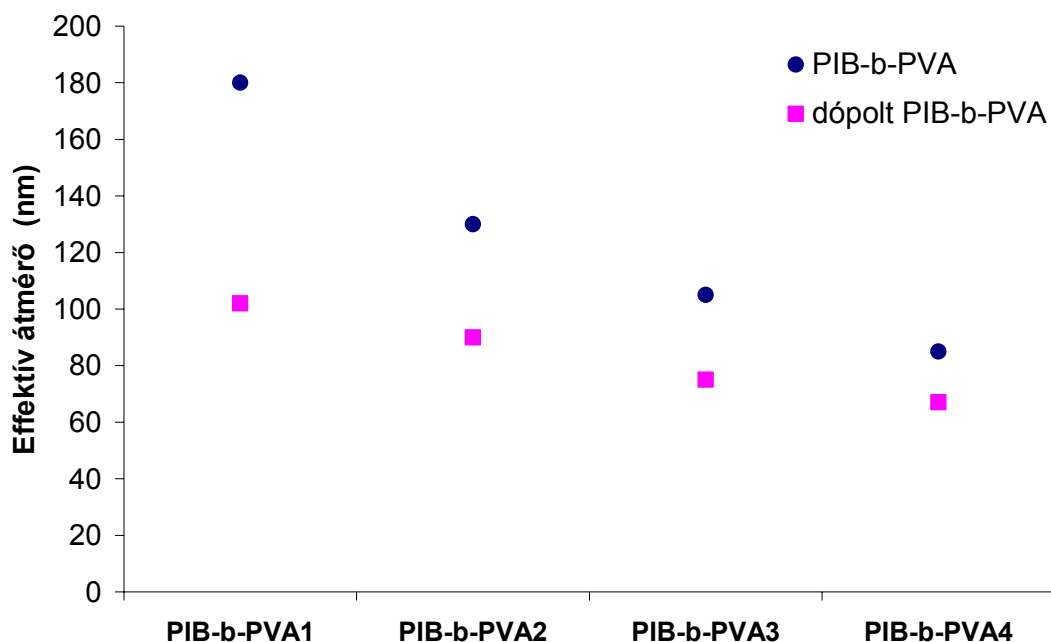
A dópolt micellák tulajdonságait szintén vizsgáltuk DLS-sel. A micella méretet és a mért cmc értékeket a 12. ábrán foglaltuk össze.



12. ábra

Dópolt PIB-b-PVA kopolimer micella mérete és cmc értékei DLS módszerrel meghatározva
(oldószer: víz, $T=25^{\circ}\text{C}$, $\Theta=90^{\circ}$)

A dópolt kopolimerek cmc értékei nem térnek el jelentősen a tiszta kopolimerek cmc értékeitől, az eltérés a mérési hibahatáron belüli (<10%). A micella méretek viszont, minden esetben csökkentek, melyet a 13. ábrán mutatunk be.



13. ábra

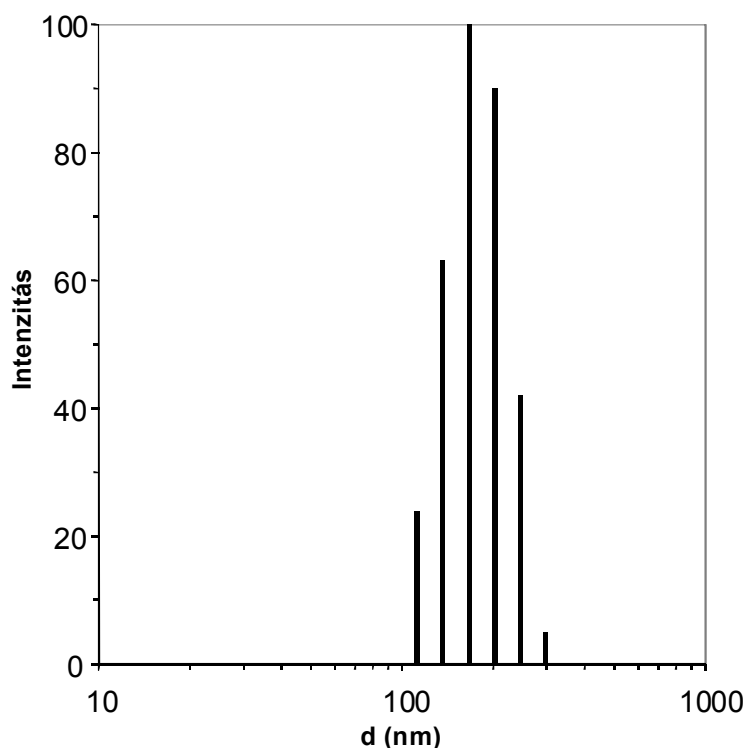
PIB-b-PVA és Indometacinnal dópolt PIB-b-PVA polimerek micella mérete.
(oldószer:víz, $T=25^{\circ}\text{C}$, $\Theta=90^{\circ}$)

A legnagyobb változást a PIB-b-PVA1 kopolimer esetén figyeltünk meg, ebben az esetben a micella méret majdnem a kiindulási méret felére csökkent (180 nm-ről, 102 nm-re), a PVA lánc növekedésével a méret csökkenés egyre kisebb mértékű, PIB-b-PVA2 esetén 40 nm, PIB-b-PVA3-4 esetén mindössze 20 nm.

III. A bisz(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén aggregációs tulajdonságának vizsgálata

Az általunk korábban előállított glükóz funkcionáliszt poliizobutilén (glu-PIB-glu) amfifilikus volta miatt képes, mind szilárd, mind oldatfázisban mikrostruktúrákat kialakítani. Az oldatfázisbeli mikrostruktúrák szerkezetének pontos ismerete elengedhetetlen a jövőbeni felhasználás szempontjából, ezért fényszórás és különböző mágneses rezonancia módszerekkel részletesen karakterizáltuk őket. Diffúziós NMR vizsgálatokkal megállapítottuk a micellák molekulatömegét, ezáltal aggregációs számát. Részletes NOESY mérésekkel kimutattuk, hogy mind az alfa mind a béta glükopiranozil végű poliizobutilén micellákat képez oldatfázisban, ahol is a cukoregységek alkotják a micella inflexibilis részét és a közöttük lévő kölcsönhatás felelős a micella összetartásért, míg a poliizobutilén láncok a micella flexibilis fázisát alkotják [3].

A Glu-PIB-Glu oldhatatlan hexánban, de könnyen fel lehet oldani tetrahydrofuranban. A Glu-PIB-Glu tetrahydrofurános és vizes oldata is szórja a fényt, amely micellák és/vagy vezikulák, azaz aggregátumok jelenlétére utal. Tetrahydrofurános oldatban az aggregátumok méreteloszlását dinamikus fényszórás fotometriával határoztuk meg (14. ábra).



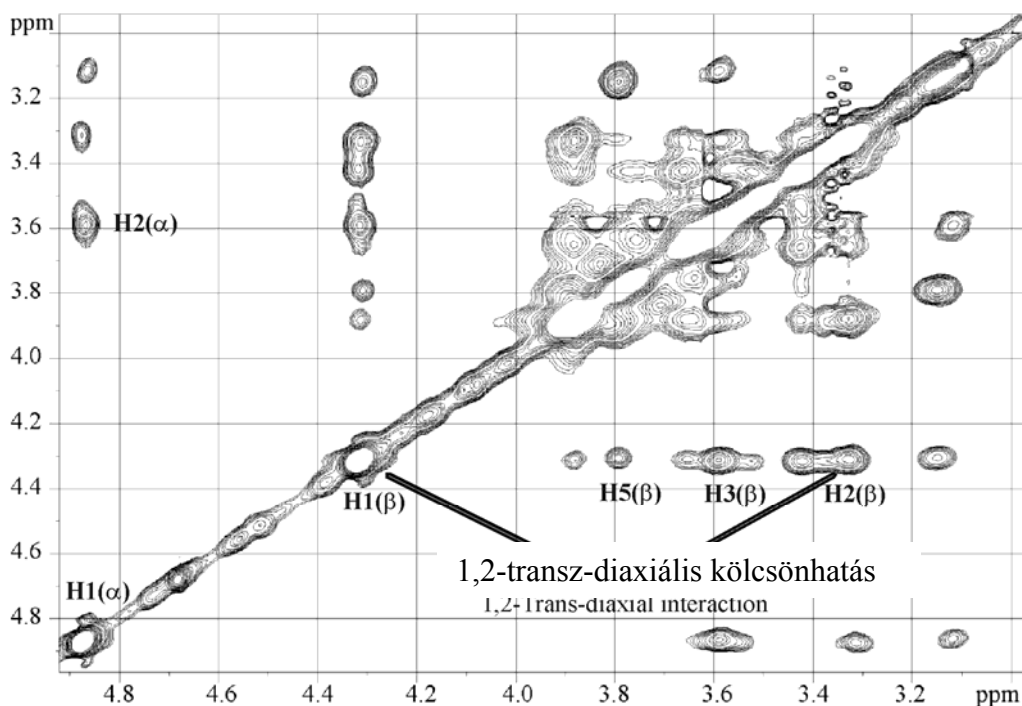
14. ábra

A bisz(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén tetrahydrofurános oldatában képződött aggregátumok méreteloszlása. ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c=25\text{ mg/mL}$, $\theta=90^{\circ}$)

Amint a 14. ábrán látható, viszonylag nagyméretű, 177 nm átlagos átmérőjű és szűk eloszlású (polidiszperzitás:1,06) aggregátumok képződtek. A tetrahidrofurán jó oldószere a poliizobutilén szegmensnek, de a glükopiranoz egységet rosszul szolvatálja; ez az oldékonyságbeli különbség okozza a polimerláncok aggregációját. Tetrahidrofuránban a glükóz egységek valószínűleg az aggregátumok belső része felé, míg a PIB szegmensek a külső rész felé orientálódnak. Ha a Glu-PIB-Glu tetrahidrofurános oldatát vízzel 1:100 (V/V) arányban kevertük, akkor a képződött aggregátumok átlagos átmérője 280 nm, polidiszperzitása 1,05.

A képződött aggregátumok legalább egy napig stabilnak bizonyultak DLS mérés alapján. Az aggregátumok külső részében levő glükopiranoz egységek jelenléte megakadályozza ezen aggregátumok nagyobb aggregátumokká való csoportosulását.

Habár a dinamikus fényszórás fotometria segítségével számos fontos információt nyerhetünk a képződött aggregátumokról (pl. átlagos részecskeméret, részecskeméret-eloszlás, stb.), azonban az aggregátumok szerkezetére vonatkozóan nem nyújt adatokat. A modern NMR módszerek, mint például a NOESY és a DOSY nemcsak a részecskék méretére, illetve tömegére vonatkozóan, hanem a képződött aggregátumok szerkezetével kapcsolatosan is szolgáltatnak információt. A Glu-PIB-Glu NOESY spektrumát a 15. ábra jeleníti meg.



15. ábra

A bis(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén NOESY spektruma (részlet).

A 15. ábrán látható jelek pozitív fázisúak. Ez a glükopiranoz gyűrű viszonylagos merevségét jelzi, ami azért meglepő, mert általában a glükopiranoz gyűrű igen flexibilis. Ezért a merevséget a micellaképződés a felelős, mivel a glükopiranoz végcsoportok egymáshoz közel helyezkednek el, a kialakuló hidrogénkötés és egyéb kölcsönhatások pedig az intramolekuláris molekuláris mozgásokat jelentősen akadályozzák. A β -D-glükopiranozid származékoknál az 1,2-transz-diaxiális NOE-kölcsönhatás az esetek túlnyomó részében kismértékű (a nagy térbeli távolság miatt), azonban a Glu-PIB-Glu esetében az anomer hidrogén (1) a legnagyobb NOE-keresztcsúcsot a 2-es hidrogénnel mutat, ami valószínűleg a micellaképződés következménye. A micellaképződés során sok esetben megfigyelték a TMS (tetrametil-szilán) jelének „megduplázódását”. A jelenség oka, hogy a micellán kívüli és a micellába beágyazott TMS molekulákra kicsit eltérő nagyságú mágneses tér hat. Az effektus kismértékű, azonban ebben az esetben is megfigyelhető volt. Az 1,2-transz-diaxiális kölcsönhatás még 2 mg/600 μ l koncentráció esetén is megfigyelhető a NOESY spektrumban.

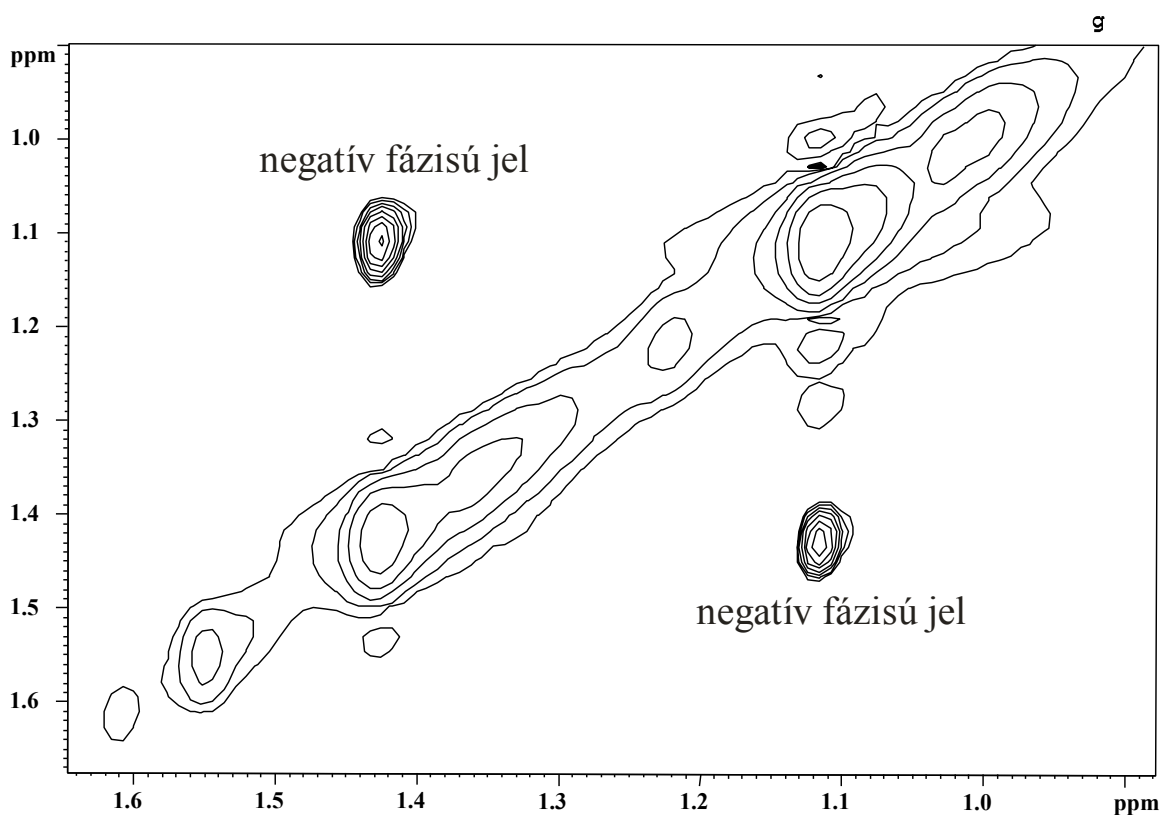
A 15. ábrán az α -anomer hidrogénnek három NOESY keresztcsúcsát figyelhetjük meg. A legintenzívebb keresztcsúcs 3,58 ppm-nél található, ez az α -anomer H2 hidrogénjének felel meg. Bár a másik két keresztcsúcsot a spektrális átfedések miatt nem lehetett egyértelműen azonosítani, azonban az kijelenthető, hogy ezek – részben – az α -anomer 4C_1 konformerének intermolekuláris kölcsönhatásainak következtében alakulnak ki, ugyanis a kevésbé valószínű 1C_4 konformer képződése esetén is csupán két intramolekuláris NOE-csúcsot kellene látnunk (H1-H2, H1-H5). Nem meglepő módon a β -anomer hidrogénnek több NOE-keresztcsúcsa van, mivel az intermolekuláris NOE-kölcsönhatásokon kívül még intramolekuláris H1-H3 és H1-H5 kölcsönhatás is megfigyelhető.

A 16. ábra a Glu-PIB-Glu NOESY spektrumának a poliizobutilén metil- és metilénprotonjainak jeleit mutatja. A 28. ábrán látható, hogy a poliizobutilénhez tartozó jelek negatív fázisúak, ez arra utal, hogy a poliizobutilén lánc viszonylag flexibilis, még asszociátumok képződése esetén is.

A képződött aggregátumok méretét DOSY technikával vizsgáltuk. A gradiens impulzusok alakját a szinusz hullám és a területek négyzetének arányának ($2/\pi$) megfelelően korrigáltuk. A látszólagos diffúziós állandókat a Stejskal-Tanner egyenlet egyszerű exponenciális illesztésével határoztuk meg.

$$\ln(R) = -\gamma^2 D G^2 \{ \delta^2 (\Delta - \delta/3) + B \}$$

, ahol R a gradiensekkel és a gradiensek nélkül mért jelek intenzitásának aránya; D a translációs diffúziós együttható; γ a vizsgált mag giromágneses hányadosa; G a B_0 gradiens térerő; δ a gradiens impulzus hossza és Δ a diffúziós késleltetés.



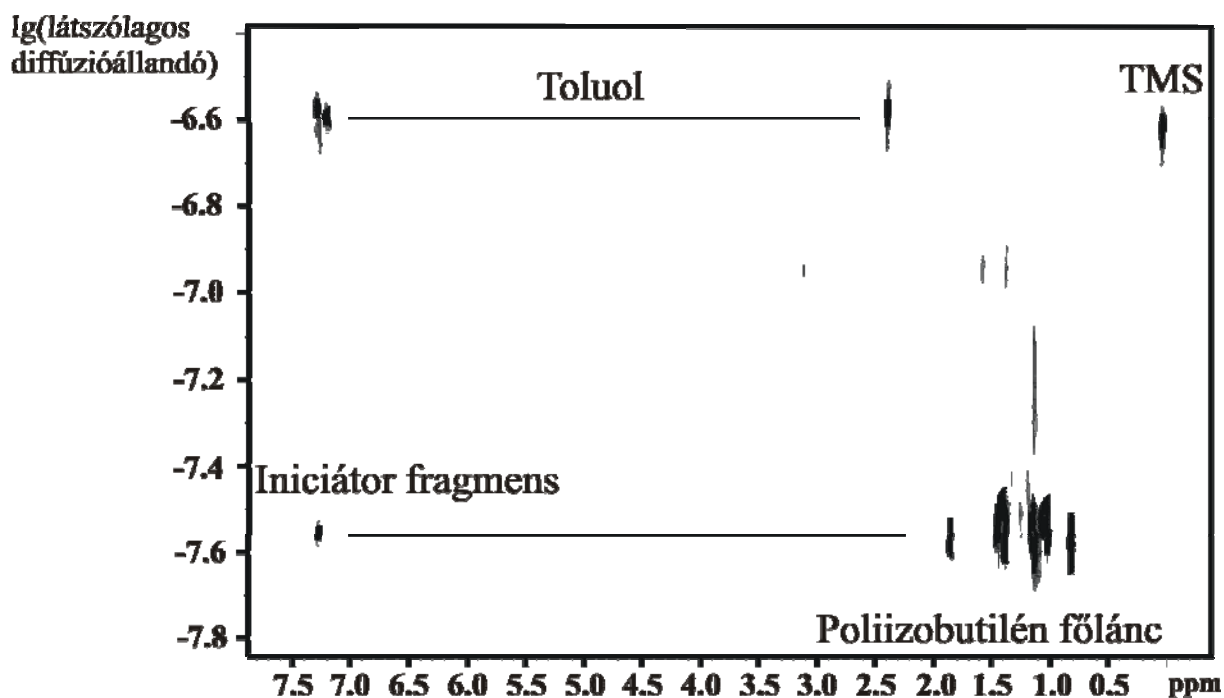
16. ábra

A bisz(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén NOESY spektruma (részlet).

($c=16,7$ mg/ml)

A belső standard használatával kiküszöbölhető a különböző koncentrációjú oldatok eltérő viszkozitása, sőt bizonyos mértékben a kísérlet hibáját is csökkenteni lehet ugyanabban az oldatban

Referencia vegyületeként tetrametil-szilánt (TMS) és toluolt alkalmaztunk. A diffúziós adatokat inverz Laplace transzformációval is feldolgoztuk (Bruker XWINNMR 2.6 DOSY Package program, beállított paraméterek: STE, biexp mode, offset fit = YES, Si1=128, Sdev = 0.04, solution bonds = 1-1000, solution grid = log-quad). Az eredményeket a következő DOSY spektrumon láthatjuk (17. ábra).



17. ábra

A bis(α,β -D-glükopiranozil) poliizobutilén ^1H -DOSY spektruma.

($c=83$ mg/ml, referenciavegyület: toluol)

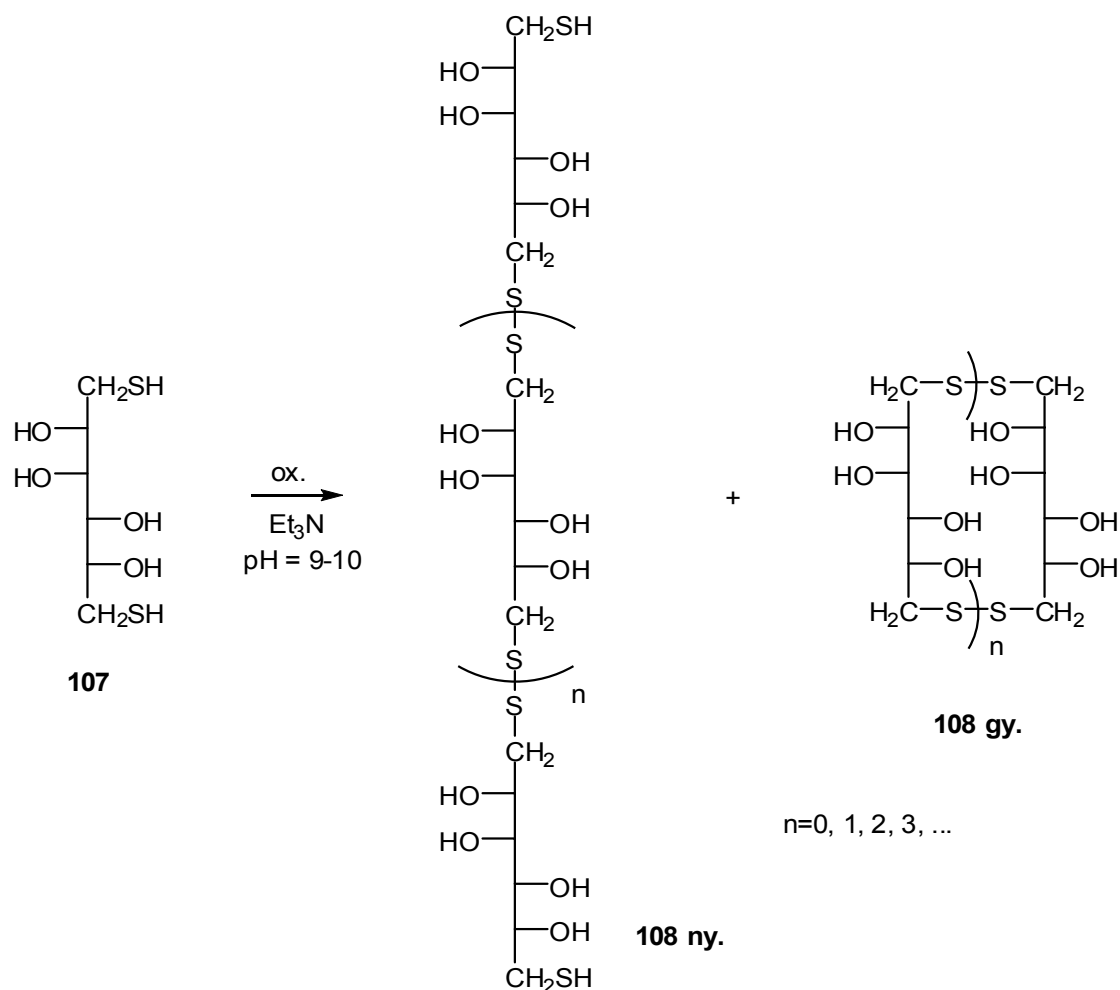
Látható, hogy a TMS és a toluol közel azonos látszólagos diffúziós állandónál jelenik meg köszönhetően hasonló molekulatömegeiknek (88 illetve 92 g/mol). Az is megfigyelhető, hogy a polimer aggregátumok tömege jóval nagyobb a polimer tömegénél. A Glu-PIB-Glu tömegét a toluol tömegéhez vonatkoztattuk, mivel a toluol relaxációja gyorsabb, mint a TMS-é, és ez a mérés szempontjából kedvezőbb.

A deuterokloroformban képződött aggregátumok molekulatömege körülbelül 30-as aggregációs számnak felel meg. Még 3,3 mg/ml koncentrációban is képződtek aggregátumok, igaz jóval kisebb, mintegy 4-es aggregációs számmal. Az aggregátumok molekulatömegének koncentrációfüggése a polimer aggregátumok nyitott asszociációs mechanizmusát jelzi. A NOESY mérésekből származó információk (a glükopiranozil gyűrűk mobilitásának meglepő hiánya, valamint a poliizobutilén láncok nagyfokú flexibilitása az aggregátumokban) alapján feltételezhető, hogy deuterokloroformban olyan micellák képződnek, melyben a glükopiranozil gyűrűk alkotják a magot, míg a héj a poliizobutilén láncokból épül fel.

IV. Az 1,6-ditio-D-mannitol polikondenzációja

Az 1,6-ditio-D-mannitol (**107**) oxidatív polikondenzációjához a levegő oxigénjét alkalmaztuk oxidálószerként [4]. A reakciókörülmények beállítása során azt tapasztaltuk, hogy savas és semleges körülmények között nem indul be az oxidáció, gyengén lúgos pH-jú oldatban (pH ~ 7,5) pedig csak igen lassan megy a reakció. Ha tiol-csoportok oxidációjára oxigént használunk oxidálószerként, akkor szükség van bázis jelenlétére. A reakciókat ezért 9-10 pH-jú oldatban végeztük.

A reakció során nyíltláncú (**108 ny.**) és gyűrűs (**108 gy.**) oligomerek is keletkezhetnek (**18. ábra**), ezért fontos a két forma keletkezésének vizsgálata, és lehetőség szerinti szabályozása.



18. ábra

Az 1,6-ditio-D-mannitol oxidatív polikondenzációja.

Vizsgáltuk a polikondenzáció idő- és oldószerfüggését is. Oldószerként desztillált vizet, metanolt, dimetil-formamidot (DMF), dioxánt és piridint alkalmaztunk. A reakcióelegyek általában 0,5 %-osak (5 mg/ml-es koncentrációjúak) voltak 1,6-ditio-D-mannitolra nézve. A keletkezett oligomereket MALDI-TOF MS módszerrel vizsgáltuk.

Az oxidatív polikondenzáció során, mint ahogyan az várható volt, gyűrűs és nyíltláncú oligomerek is keletkeztek a körülményektől függően. A MALDI-TOF tömegspektrumok alapján a trimertől kezdve fokozatosan csökken az egyes oligomerek mennyisége a reakcióelegyen. A polikondenzáció legtöbbször 10-12 monomer összekapcsolódásáig ment el, 2500-as tömegegység felett már általában alig volt látható molekulacsúcs a spektrumban. Ez azzal magyarázható, hogy a nagyobb molekulatömegű egységek vagy kiváltak az oldatból, vagy pedig a gyűrűképződések miatt leállt a polikondenzáció.

A szakirodalom tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy a néhány monomeregységből álló, közepes méretű gyűrűs diszulfidokat oxidációval általában csak igen híg oldatokban lehet előállítani, és a reakció hozama legtöbbször nem túl jó. Ezzel szemben az általunk végzett reakciók egyik érdekessége az volt, hogy az oldószer minőségével befolyásolni lehetett a gyűrűs és a nyíltláncú forma keletkezését. Míg pl. DMF-ben és deszt. vízben a gyűrűs oligomerek keletkeztek nagyobb mennyiségben (~ 90 %-ban), addig metanolban és dioxánban a nyíltláncú forma volt túlsúlyban (5. táblázat).

Az oxigénen kívül más oxidálószerket is kipróbáltunk. Az oxidáció gyorsabban végbement, és azt tapasztaltuk, hogy az oxidálószer minősége is befolyásolhatja a nyíltláncú és gyűrűs forma arányát a reakcióelegyen. Jód esetén pl., ha metanolban végeztük az oxidációt, a várt nyíltláncú oligomerek helyett gyűrűs molekulák keletkeztek. $K_3[Fe(CN)_6]$ -os oxidáció esetében oldószerként DMF/víz elegyet használtunk. Mindkét oldószer esetében gyűrűs oligomerek keletkezését vártuk, és trietilamin jelenlétében valóban gyűrűbe záródtak a molekulák. Ezzel szemben, ha a $K_3[Fe(CN)_6]$ mellett nem volt jelen bázis a reakcióelegyen, nyíltláncú oligomerek keletkeztek (5. táblázat).

5. táblázat

A polikondenzáció során keletkezett gyűrűs és nyíltláncú trimer aránya különböző oldószerek és oxidálószeres esetén.

Oldószer	Reakcióidő	Gyűrűs trimer (m/z = 659 Th) (%)	Nyíltláncú trimer (m/z = 661 Th) (%)
DMF	1 hét	~ 90	~ 10
MeOH	1 hét	< 5	> 95
H ₂ O	1 hét	> 85	< 15
piridin	1 hét	~ 88	~ 12
dioxán	1 hét	~ 20	~ 80
MeOH / I ₂	6 óra	~ 90	~ 10
DMF/H ₂ O, K ₃ [Fe(CN) ₆]	6 óra	~ 90	~ 10
DMF/H ₂ O K ₃ [Fe(CN) ₆], ø Et ₃ N	6 óra	~ 20	~ 80

Az oligomerek közül legtöbbször a trimer esetén a legnagyobb a gyűrűs forma aránya, és ahogy nő a polimerizáció foka, annál több nyíltláncú forma van jelen a gyűrűs oligomerek mellett (6. táblázat).

6. táblázat

Az egyes oligomerek esetén a gyűrűs és a nyíltláncú forma százalékos aránya.

Oldószer	Trimer gy. / ny.	Tetramer gy. / ny.	Pentamer gy. / ny.	Hexamer gy. / ny.	Heptamer gy. / ny.
H ₂ O	88 / 12	87 / 13	81 / 19	75 / 25	67 / 33
MeOH	7 / 93	6 / 94	< 1 / > 99	< 1 / > 99	< 1 / > 99
DMF	90 / 10	86 / 14	79 / 21	71 / 29	58 / 42

Vizsgáltuk a reakció koncentrációfüggését is metanolban és vízben. A koncentráció növelésével csökkent a gyűrűs oligomerek aránya a nyíltláncúakhoz képest (7. táblázat).

7. táblázat

A nyíltláncú és a gyűrűs forma százalékos aránya a koncentráció függvényében.

MeOH	Koncentráció (%)	Trimer gy. / ny. (%)	H ₂ O	Koncentráció (%)	Trimer gy. / ny. (%)
	0,1	22 / 78		0,1	94 / 6
	0,25	10 / 90		0,25	86 / 14
	0,55	7 / 93		0,5	85 / 15

Az oligomerizáció semleges közegben, enyhe körülmények között is véghezvihető, ha reagensként dimetilszulfoxidot (DMSO-t) használunk. A reakció során a tiolból diszulfid lesz, és a DMSO dimetil-szulfiddá redukálódik. α,ω -Ditio-polietilén-glikolokat illetve -oligoetilén-glikolokat is polikondenzáltattak már DMSO jelenlétében. A reakciókban oldószerként DMSO vagy DMSO-víz keveréket használtak. Azt tapasztalták, hogy a legjobban akkor ment a polikondenzáció, ha az oldószer mennyiségének csak 20 %-a volt a DMSO.

Három párhuzamos kísérletet végeztünk (8. táblázat). Az elsőben csak DMSO volt jelen oldószerként, a másodikban DMSO:víz = 1:1 arányt alkalmaztunk, a harmadikban pedig csak 20 %-nyi DMSO volt jelen a víz mellett. A reakcióelegyek 0,25 %-osak voltak 1,6-ditio-mannitolra nézve, és bázis jelenlétére nem volt szükség a reakció lejátszódásához. Az első esetben ment a leglassabban az oxidáció, a harmadik esetben pedig a keletkező oligomerek egy idő után kiváltak az oldatból. A jelen levő 20 %-nyi DMSO nem volt elegendő ahhoz, hogy oldatban tartsa a nagyobb polimerizációfokú oligomereket.

A legjobbnak a DMSO:víz = 1:1 arány bizonyult. A reakcióelegyben már négy nap után jelentős mennyiségű (85-90%) gyűrűs oligomer volt jelen. Mint már láthattuk korábban, a DMSO-val történő diszulfidképzési reakciókban lineáris diszulfid-polimereket kaptak termékként és csak igen híg oldatot használva keletkeztek gyűrűs polimerek a reakciók során. Ezzel szemben, az 1,6-ditio-mannitol DMSO-víz elegyben történő polikondenzációjakor nagy százalékban gyűrűs oligomerek keletkeztek.

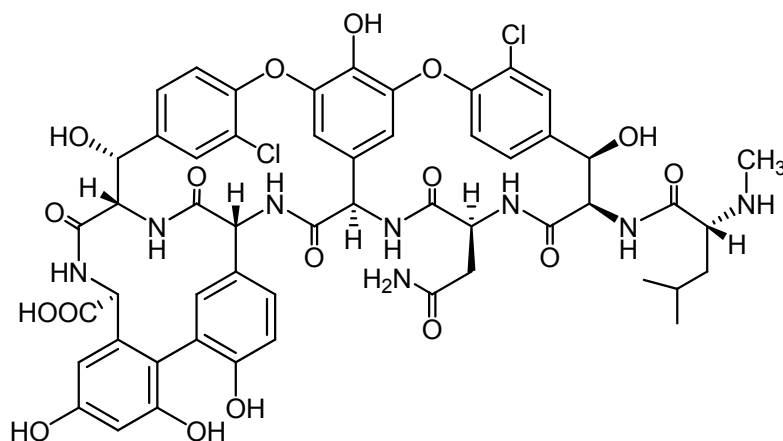
8. táblázat
Az 1,6-ditio-D-mannitol reakciója DMSO-val.

DMSO : H ₂ O	Reakcióidő	Gyűrűs trimer (%)	Nyíltláncú trimer (%)	Polimerizációfok
1 : 0	4 nap	5	95	5
	9 nap	18	82	7
1 : 1	4 nap	91	9	13
1,6 : 0,4	4 nap	86	14	14

4.2. A templáteffektus tanulmányozása

Számos olyan gyógyszermolekula létezik, ami nem vagy csak igen rosszul oldódik vízben. A keletkezett gyűrűs cukor-oligomerek alkalmasak lehetnek ezen vegyületek molekuláris kapszulázására. Az oligomerek hidroxil-csoportjai hidrogénkötések segítségével hozzákapcsolódhatnak a megfelelő célmolekulához, és ezzel növelhetik vízoldhatóságát.

A vankomicin egy glikopeptid antibiotikum, mely a Gram-pozitív baktériumok sejtfalának bioszintézisét gátolja. Olyan esetekben alkalmazzák, amikor egyéb antibiotikumok hatástalanok, pl. multirezisztens törzseknél. Manapság egyre nagyobb problémát jelent, hogy újabb és újabb vankomicinrezisztens baktérium törzsek jelennek meg. Ezért a meglevő antibiotikumok módosításával új származékokat állítanak elő a rezisztencia kivédésére. A vankomicin diszacharid egységének eltávolításával kaphatjuk meg a vankomicin aglikont (**110**), amely egy szintén antibakteriális hatású vegyület. Mivel az aglikon vízoldhatósága meglehetősen rossz, és a molekula mérete viszonylag nagy, ezért ezt a vegyületet választottuk modellvegyületnek a templáteffektus tanulmányozásához. Az is előnyt jelent, hogy a molekula számos hidrogén-kötés kialakítására képes, ezért erős kölcsönhatás jöhet létre a mannitol-oligomerekkel.



110

Vankomicin aglikon.

Vizes oldatban templátmolekulaként alkalmaztuk a vankomicin aglikont. A cél az volt, hogy körülfogjuk a molekulát gyűrűs cukor-oligomerekkel, és ezáltal növeljük a vízzoldhatóságát. Az oligomerizációt vankomicin aglikon jelenlétében hajtottuk végre. Azt vártuk, hogy majd gyűrűs oligomerek fognak keletkezni, ezzel szemben nagy százalékban a nyíltláncú forma került túlsúlyba (9. táblázat).

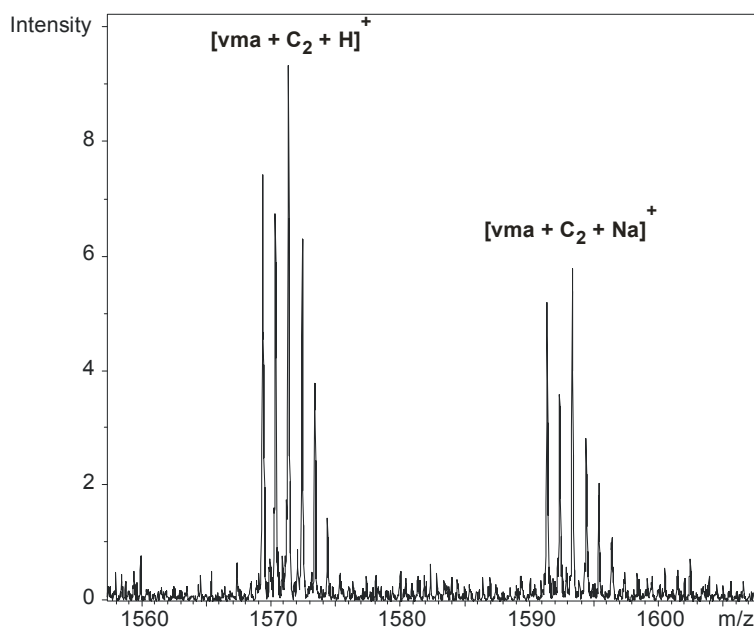
9. táblázat

A gyűrűs és a nyíltláncú oligomerek arány vízben vankomicin aglikon jelenléte nélkül és jelenlétében.

	Trimer gy. / ny. (%)	Tetramer gy. / ny. (%)	Pentamer gy. / ny. (%)	Hexamer gy. / ny. (%)	Heptamer gy. / ny. (%)
H₂O	88 / 12	87 / 13	81 / 19	75 / 25	67 / 33
H₂O Vank. agl.	11 / 89	12 / 88	8 / 92	9 / 91	8 / 92

A vankomicin aglikon és az 1,6-ditio-D-mannitol feltételezhetően hidrogénkötések segítségével összekapcsolódik, és erről az adduktumról indul el a polikondenzációs folyamat. A keletkező oligomerek feltekerednek a templátmolekulára, és ez gátolja a láncvégi tiolesoportok reakcióját a láncközi diszulfidhidakkal, az úgynevezett „back-biting” reakciót. Ennek következtében gyűrűs diszulfidok helyett nyíltláncú oligomerek keletkeznek. A

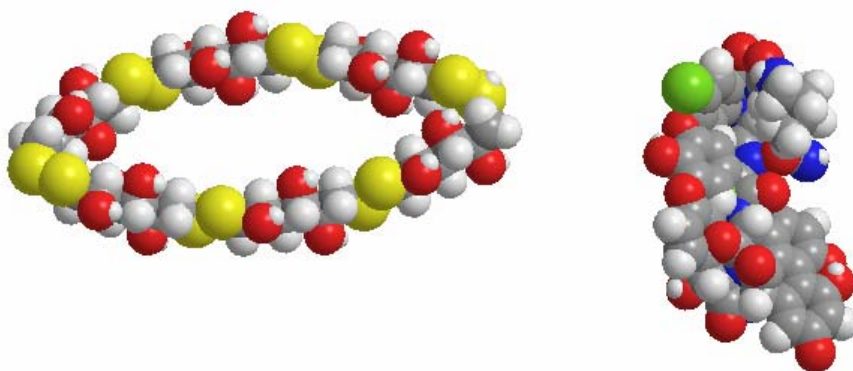
vankomicin aglikonból és a diszulfid-oligomerekből kialakuló asszociátumok jelenlétét ESI-TOF MS módszerrel is alátámasztottuk. A komponensek között kialakuló erős kölcsönhatást mutatja, hogy a nyíltláncú oligomereket és vankomicin aglikont tartalmazó oldat ESI-TOF tömegspektrumában megtalálhatóak a képződő aglikon-oligomer molekulakomplexek jelenlétére utaló csúcsok. A 19. ábra ennek a tömegspektrumnak egy részletét mutatja, ahol a vankomicin aglikon nyíltláncú dimerrel alkotott asszociátumának proton- illetve nátriumcsúcsa látható.



19. ábra

A vankomicin aglikon nyíltláncú dimerrel alkotott asszociátumának proton- illetve nátriumcsúcsa az ESI-TOF tömegspektrumban.

A 20-as ábrán egy hexamer és egy vankomicin aglikon molekula 3 dimenziós ábrája található. Jól látható, hogy a hexamer molekula mérete alkalmas arra, hogy kialakítson egy olyan gyűrűt, ami körül foghatja a vankomicin aglikont.



20. ábra

A hexamer és a vankomicin aglikon 3 dimenziós ábrája.

A vankomicin aglikon oldódásának ditio-mannitol-származékok hatására bekövetkező növekedését UV-VIS spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk. Az aglikon abszorbanciájának kb. 278 nm-en van maximuma, ezen a hullámhosszon a ditio-mannitol oligomerjeinek nincs elnyelése. Az oldódás mértékének meghatározásához kalibráló egyenest vettünk fel. Ezután megvizsgáltuk a ditio-D-mannitol monomert, a nyíltláncú oligomereket és a gyűrűs oligomereket tartalmazó oldatok hatását is a vankomicin aglikon oldódására. Kétszeresére hígított, vankomicin aglikonra nézve telített oldatokat használtunk a méréshez. A ~278 nm-en mért maximumok és a kalibráló egyenes alapján meghatározható az adott minta aglikonkoncentrációja.

Legjobban a nyíltláncú oligomereket tartalmazó oldat növelte meg az aglikon oldhatóságát vízben. A kalibráló egyenesről leolvashatóak az egyes abszorbanciaértékekhez tartozó koncentrációk (10. táblázat). A %-ban megkapott értékeket kettővel megszorozva kapjuk a tényleges koncentrációkat, mivel kétszeresére hígított mintákat használtunk.

10. táblázat

Az 1,6-ditio-D-mannitol és a különböző diszulfid-oligomer oldatok hatása a vankomicin aglikon vízdoldhatóságára.

minta	abszorbancia	koncentráció/2 (%)	tényleges koncentráció (%)
vankomicin aglikon (v.a.) oldat	1,1998	0,117	0,234
v.a. + ditio-mannitol monomer	1,5020	0,146	0,292
v.a. + gyűrűs oligomerek	1,5881	0,155	0,310
v.a. + nyíltláncú oligomerek	1,9651	0,191	0,382

Molekuláris kapszulázással tehát több mint 60 %-kal növelni tudtuk a vankomicin aglikon vízdoldhatóságát. Mivel az 1,6-ditio-D-mannitol oldhatósága is korlátozott vízben a molekulán levő nagy térkitöltésű kénatomok miatt, ezért az aglikon további oldásának céljából nem lehet jelentősen tovább növelni a monomer koncentrációját.

V. Neodol minták karakterizálása és önszerveződése

5.1. Neodol minták karakterizálása

A nemionos felületaktív anyagok a legfontosabb vegyületek közé tartoznak az iparban és a kutatásban egyaránt. Az etilén-oxid bázisú felületaktív anyagok legtöbbször különböző molekulatömegű tenzidek keverékei. Az ilyen típusú vegyületek egyik legfontosabb paramétere a HLB érték (hydrophile-liphophile balance), ami egy nemionos tenzid hidrofilitását mutató empirikus érték és a következő összefüggéssel számolható:

$$HLB=20(1 - M_L/M_T)$$

Ahol M_L a molekula hidrofób részének a tömege, M_T pedig a tenzid molekula teljes tömege. A HLB értékkel jól leírható egy nemionos tenzid emulzióképző tulajdonsága vizes vagy olajos rendszerekben, ezért a nemionos felületaktív anyagok HLB értékének a meghatározása a mindennapi felhasználás szempontjából fontos, mert ezzel behatárolhatók a nemionos tenzidek felhasználási területei is. Ha ezeket az anyagokat vízben oldjuk, akkor az amfilikus molekulák önszerveződése révén változatos formájú aggregátumok jöhetnek létre a molekulaszervezettől, és fizikai paramétereiktől függően. A kialakuló aggregátumok mikroszerkezete fontos, mind termékstabilitás, mind környezetvédelmi szempontból.

Vizsgálatainkhoz használt Neodol 91 alkohol-etoxilát sorozat egy az iparban széles körben elterjedt nemionos felületaktív anyag. Mivel ezek polidiszperz rendszerek ezért, mielőtt önszerveződő tulajdonságait vizsgáltuk volna, karakterizáltuk a mintákat [5].

Mivel a MALDI technika egy viszonylag gyors eljárás a molekula tömegek meghatározására ezért vizsgáltuk, hogy alkalmazható-e, a vizsgált Neodol sorozat molekula tömegének a meghatározására. A minták számátlag molekula tömegét $^1\text{H-NMR}$ módszerrel is meghatároztuk, és ezt tekintettük referencia molekula tömegnek és az ebből számolt HLB értéket pedig referencia HLB értéknek.

A $^1\text{H-NMR}$ és MALDI-TOF-MS spektrumokból meghatározott M_n és HLB értékeket a 11. táblázatban foglaltuk össze:

11. táblázat.

MALDI-TOF-MS és ^1H -NMR módszerekkel meghatározott Neodol minták számátlag
molekulatömege és HLB értéke

	Neodol 91-2.5E	Neodol 91-5E	Neodol 91-6E	Neodol 91-8E
Kiindulási alkohol	C ₉ -C ₁₁	C ₉ -C ₁₁	C ₉ -C ₁₁	C ₉ -C ₁₁
M _n (g/mol), MALDI/ ^1H NMR/gyártó	429/257/270	506/370/387	590/410/424	614/486/512
HLB, MALDI/ ^1H NMR	12,8/7,7/8,1	13,8/11,5/11,6	14,6/12,3/12,5	14,8/13,5/13,7
HLB MALDI/ ^1H NMR eltérése a gyártó által megadott értéktől (%)	58/5	19/0,9	17/1,6	8/1,4

A táblázat adataiból jól látható, hogy jelentős különbség van a MALDI-TOF MS-sel és az ^1H -NMR-rel meghatározott molekula tömegek és HLB értékek között. Az adatokból egyértelműen látszik, hogy a MALDI-TOF-MS spektrumokból számított M_n és HLB értékek minden esetben nagyobbak, mint az ^1H -NMR-rel meghatározott értékek.

A különbségek a két módszerrel meghatározott M_n és HLB értékek között csökkennek az EO csoportok számának növekedésével az összetartozó Neodol minták esetében.

Ezen eredmény azt mutatja, hogy a MALDI-TOF MS spektrumban a nagyobb EO láncot tartalmazó oligomerekből származó jelek lesznek a meghatározóak és nem a rövidebb EO láncokat tartalmazóak, ami egy eltolódást okoz a nagyobb M_n értékek felé. Ennek az eltolódásnak a magyarázata, hogy azok az oligomerek, melyek hosszabb hidrofíl részt tartalmaznak (több EO egységet) könnyebben ionizálódnak, és ezeknek a molekuláknak az ionizációs határfoka magasabb, mint a rövidebb EO csoportokat tartalmazó oligomereknek.

Míg az M_n és a HLB érték jelentősen függenek az EO lánc hosszától, addig a C₉, C₁₀ és C₁₁ alkoholokból felépülő oligomerek relatív csúcsintenzitása ($r(\text{C}_9)$, $r(\text{C}_{10})$, $r(\text{C}_{11})$) független az EO egységek számától, amit a 21. ábra is mutat. A relatív csúcsintenzitásokat 3-5 egyenlet alapján határoztuk meg, ahol I_{C_9} , $I_{\text{C}_{10}}$ és $I_{\text{C}_{11}}$, a C₉, C₁₀ és C₁₁ alkoholokból felépülő oligomerek MALDI-TOF MS csúcsintenzitásai.

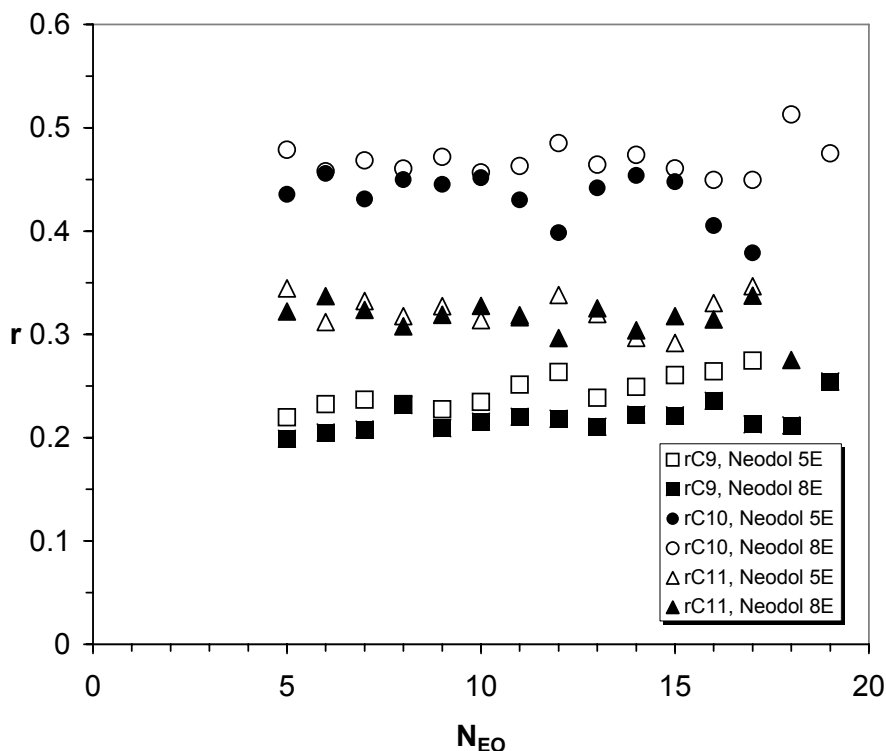
$$r(\text{C}_9) = I_{\text{C}_9} / (I_{\text{C}_9} + I_{\text{C}_{10}} + I_{\text{C}_{11}}) \quad (3)$$

$$r(\text{C}_{10}) = I_{\text{C}_{10}} / (I_{\text{C}_9} + I_{\text{C}_{10}} + I_{\text{C}_{11}}) \quad (4)$$

$$r(C_{11}) = I_{C_{11}} / (I_{C_9} + I_{C_{10}} + I_{C_{11}})$$

$$r(C_{11}) = 1 - r(C_9) - r(C_{10}) \quad (5)$$

Az eredményeket a 21. ábrán mutatjuk be. A C₉, C₁₀ és C₁₁ alkohol alapú oligomerek relatív csúcsintenzitása azonos, alacsony (4-5 EO egység) és magas (18-19 EO egység) EO összetétel esetén is, függetlenül a Neodol minták természetétől.



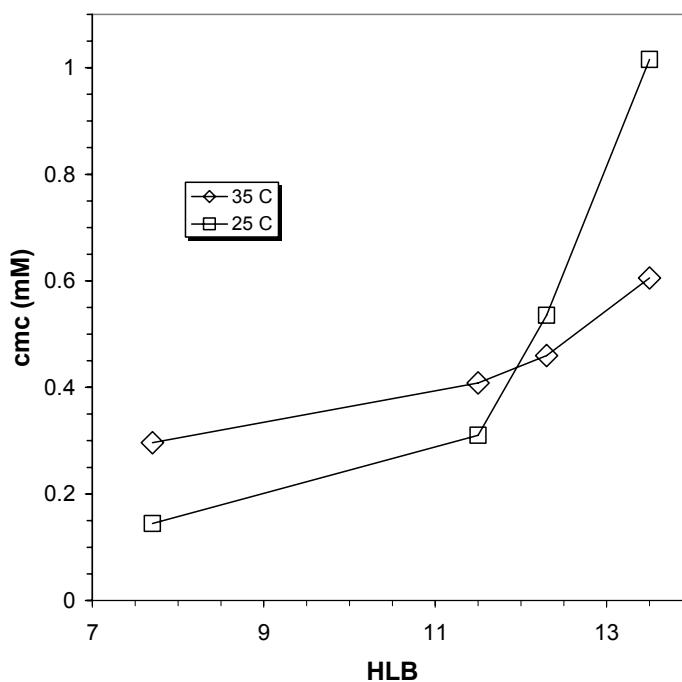
21. ábra

Neodol 91-5E és Neodol 91-8E MALDI-TOF MS csúcsok relatív intenzitása (r) az EO csoportok számának függvényében (n_{EO}).

A 21. ábra alapján, valamint feltételezve, hogy a végcsoportok módosítása egy vagy két CH₂ egységgel nincs jelentős hatással az ionizáció hatásfokára, arra következtethetünk, hogy valamennyi Neodol minta megközelítőleg 50% C₁₀, 30% C₁₁ és 20% C₉ alkoholból épült fel. Mivel általánosan elfogadott, hogy az ¹H-NMR protonok jele arányos a proton koncentrációval, ezért mi is elfogadtuk, hogy a ¹H-NMR-rel kapott M_n és HLB értékek a helyesek.

5.2. Neodol minták önszerveződése

Vizsgáltuk, hogyan változik a kritikus micella képződési koncentráció a Neodol minták HLB értékének a változásával. Azt vártuk, hogy a nagyobb hidrofil részt tartalmazó minták (ami magasabb HLB értéket is jelent), jobban oldódnak vízben, mint azok, amelyek rövidebb hidrofil láncsal rendelkeznek. A lipofil rész hossza minden minta esetén állandó volt. Ezért azt is vártuk, hogy a különböző Neodol minták cmc-je növekszik a HLB értékkel, amit a méréseink be is igazoltak, ezt a 22. ábrán mutatjuk be:



22. ábra

Neodol minták cmc változása a HLB érték függvényében

T=25 °C, 35 °C

Azért, hogy a kritikus micella képződési koncentráció HLB érték függését megmagyarázhassuk, először a micella képződés termodinamikájából kell kiindulnunk. A micella képződés szabadentalpiája a (6) egyenlettel adható meg:

$$\Delta G_{mic}^{\circ} = RT \ln(cmc) \quad (6)$$

A ΔG_{mic}° kifejezhető, mint

$$\Delta G_{mic}^{\circ} = \Delta G_{lip}^{\circ} + \Delta G_{hyd}^{\circ} \quad (7)$$

Ahol ΔG_{lip}° és ΔG_{hyd}° a lipofil és a hidrofil rész hozzájárulása a teljes szabadentalpiához.

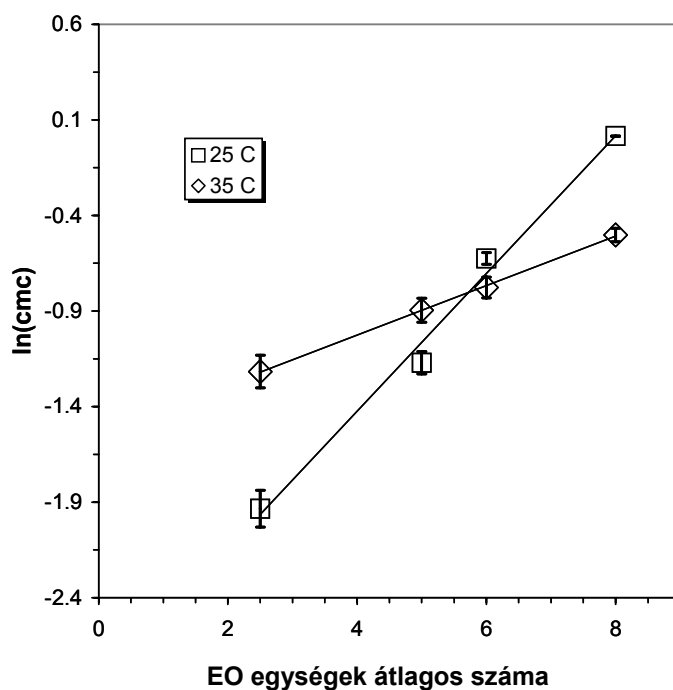
Ha ΔG_{EO}° egy EO csoport szabadentalpiájának a hozzájárulása a ΔG_{hyd}° -hoz, akkor n számú EO csoportból álló hidrophil rész esetén a ΔG_{hyd}° -t a következő összefüggéssel fejezhetjük ki:

$$\Delta G_{hyd}^\circ = n\Delta G_{EO}^\circ \quad (8)$$

A (7) és a (8) egyenletet visszahelyettesítve a (6) egyenletbe akkor a következő összefüggést kapjuk:

$$\ln(cmc) = \Delta G_{lip}^\circ / (RT) + n\Delta G_{EO}^\circ / (RT) \quad (9)$$

A (9) egyenlet azt mutatja, hogy ha az $\ln(cmc)$ -t ábrázoljuk a molekulában található EO csoportok számának (n) a függvényében, akkor egyenest kell kapjunk, ahol az egyenes meredeksége $\Delta G_{EO}^\circ / RT$. Itt kell megjegyezni, hogy ez csak abban az esetben igaz, ha a lipofil rész nem változik. A fenti levezetés igazolására az $\ln(cmc)$ -t ábrázoltuk az átlagos EO szám függvényében különböző hőmérsékleten (23. ábra).



23. ábra

$\ln(cmc)$ változása az EO átlagos számának függvényében
(T=25 °C, 35 °C)

A kapott egyenesek meredekségéből meghatároztuk, hogy $\Delta G_{EO}^\circ = 0,9$ kJ/mol 25 °C-on és 0,3 kJ/mol 35 °C-on.

Ez alapján a kritikus micella képződési koncentráció HLB érték függése most már könnyen megmagyarázható, ha figyelembe vesszük, hogy az EO csoportok átlagos száma arányos HLB/(20-HLB) értékkel.

Vizsgáltuk a Neodol mintákból képződött micellák méretét is fényszórás fotométerrel. A DLS mérések eredményét a 12. táblázatban foglaltuk össze:

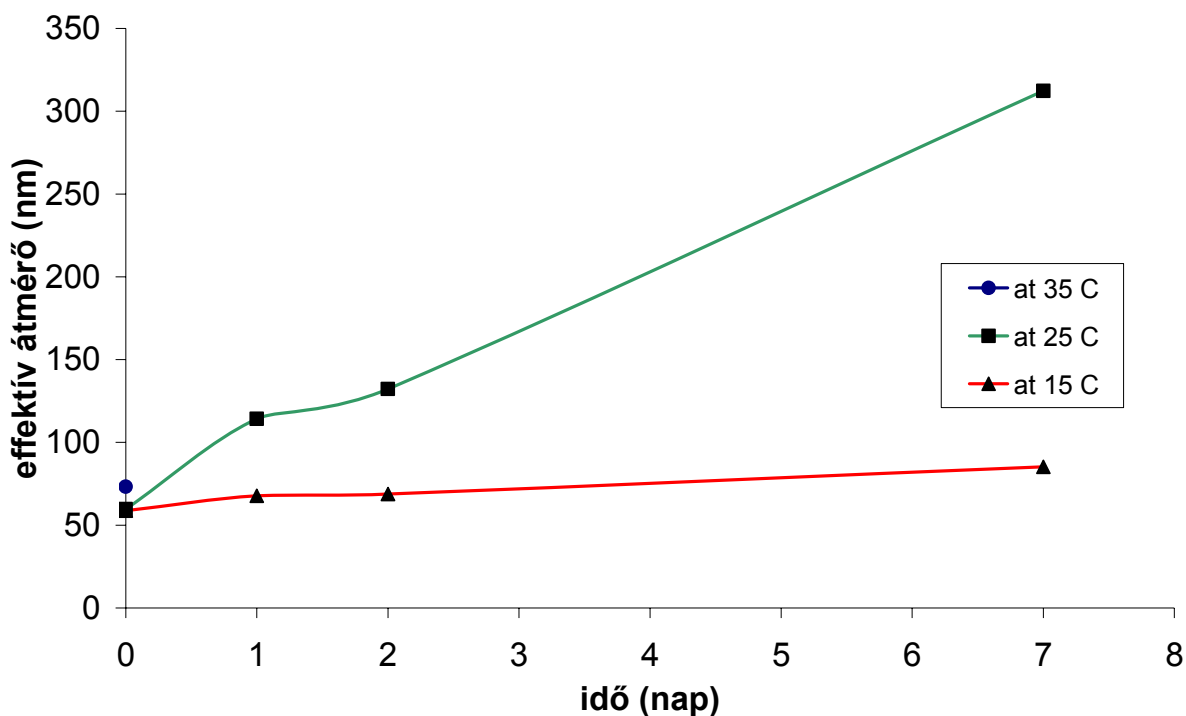
12. táblázat
Effektív micella átmérők 25 és 35 °C-on, DLS módszerrel meghatározva. A zárójelben a részecske méret eloszlását is feltüntettük

	Neodol 91-2.5E	Neodol 91-5E	Neodol 91-6E	Neodol 91-8E
Effektív átmérő (nm), T=25 °C	326 (0,29)	135 (0,33)	60 (0,20)	5,4 (0,48)
Effektív átmérő (nm), T=35 °C	232 (0,49)	78 (0,29)	73 (0,18)	6,6 (0,31)

A táblázat adataiból jól látható, hogy a micella mérete csökken a HLB érték növekedésével. Blokk kopolimerek esetén jól ismert, hogy blokkszelektív oldószerben oldva az ilyen típusú vegyületeket, mind az összetételük, mind a szerkezetük befolyásolja a képződő aggregátum szerkezetét és méretét. Az nyilvánvaló, hogy a Neodol minták esetén a micella méret nagyban függ a hidrofil rész hosszától. Már korábban bizonyították, hogy a rövid jól oldódó részt tartalmazó tenzideket blokkszelektív oldószerben oldunk (pl. hidrofil lánc rövid a hidrofóbhoz képest, és poláris oldószert használunk), vezikula képződése a valószínűbb. Ha a jól oldódó lánc hossz növekszik, egyre inkább mag-héj típusú micellák képződése várható. A Neodol minták esetében a vízben jól oldódó rész az EO lánc, ezért az EO lánc hossza meghatározza a vízben képződő aggregátumok méretét és szerkezetét. Az aggregátumok mérete függ a hőmérséklettől is. A legvalószínűbb, hogy a hőmérsékletfüggést az EO lánc és a víz molekulák közötti kölcsönhatás okozza. A hőmérséklet emelése a konformáció változáshoz vezethet, ami azt jelenti, hogy alacsonyabb hőmérsékleten a polárisabb konformer a dominánsabb, míg magasabb hőmérsékleten a kevésbé poláris rész lesz a meghatározó. Az ilyen típusú újraszerveződésre mutat jó példát a micella méret változása a hőmérséklet függvényében a Neodol minták esetén.

Vizsgáltuk a micellák időbeli stabilitását is. A vizsgálat időtartama minden esetben egy hét volt. A méréseket 15, 25 és 35 °C-on végeztük, az oldat készítésekor valamint 1-2-7 nap után. A mintákat a két mérés között is a mérés hőmérsékletén termosztálva tartottuk. A

Neodol 91-5E és 6 E minták esetén micellák mérete növekedett az idő függvényében és ez a méretnövekedés a hőmérséklet emelkedésével egyre nagyobb mértékű volt. 35 °C-on már 2 nap után sem tudtuk a micellák méretét meghatározni, a lézer fényben átúszó aggregátumok miatt, ugyanakkor a 15 °C-on a micellák mérete alig változott (24. ábra).



24. ábra

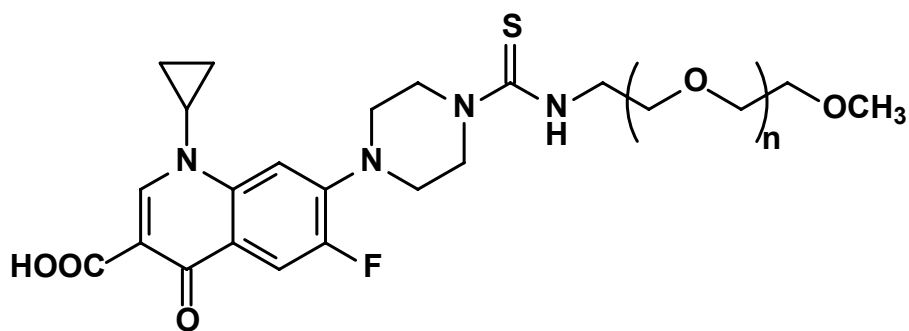
Neodol 91-6E minta micella átmérő változása az idő függvényében különböző hőmérsékleten

A diszperz rendszereinkben magasabb hőmérsékleten az aggregációs folyamatok lényegesen gyorsabban játszódtak le, mint alacsony hőmérsékleten. Mivel nemionos tenzideket használtunk, a micellákat hidrát réteg stabilizálja és akadályozza meg a diszperz rendszer azonnali koagulálását. A hőmérsékletet emelve a tenzid molekulák etilén-oxid csoportjainak (így a micellának is) a hidratációja csökken, ami először micella méret növekedését okozza, majd a hőmérséklet további növelésével a rendszerben két fázis kialakulásához vezet. A képződött aggregátumok nagysága sokszorososa a kiindulási micella méretének. Ez a folyamat a hőmérséklet növelésével gyorsul. A Neodol 91-2.5E és 8E minták esetén (azaz a legkisebb és legnagyobb EO láncot tartalmazó tenzidek esetén) a micellák mérete számottevően nem változott az idővel, még a 35 °C-on sem. Aminek az lehet a magyarázata, hogy a Neodol 91-2.5 E minta esetén az etilén-oxid lánc hossza nagyon rövid, míg a Neodol 91-8E mintáknál túl hosszú ahhoz, hogy abban a hőmérséklet tartományban, amiben dolgoztunk (25 ± 10 °C) a molekulák hidratációját a hőmérséklet emelése jelentősen befolyásolhatta volna.

VI. Ciprofloxacin-Poli(etilén-glikol) konjugátum fragmentációs viselkedésének tanulmányozása

Munkánk során ciprofloxacin-poli(etilén-glikol) konjugátum fragmentációs viselkedését tanulmányoztuk ESI tömegspektrometriás körülmények között. Lítium, nátrium és kálium ionokkal képzett egyszeres, kétszeres és háromszoros töltésű addukt ionok fragmentációját vizsgáltuk az ütközési energia függvényében [6]. A fragmentációs viselkedés jobb megértése érdekében más kis molekulatömegű anyagok és poliéterek tömegspektrometriás vizsgálatát is elvégeztük [7-9].

A ciprofloxacin a fluoroquinolonok csoportjának egyik legjelentősebb képviselője. Gyakran használják széles spektrumú antibiotikumként, mind emberi, mind állati szervezetben baktériumos fertőzések megelőzésére és kezelésére. Az élelmiszerekben visszamaradó antibiotikumok által kiváltott rezisztancia elkerülésére az Európai Unió szabályozást vezetett be az élelmiszerekben található antibiotikumok mennyiségének korlátozására. A szigorú szabályozás miatt egész sor kvalitatív és kvantitatív analitikai módszert fejlesztettek ki az antibiotikumok meghatározására. Leghatékonyabb a folyadékkromatográfiával csatolt tömegspektrometria. Ezért nagyon fontos az antibiotikumok, közöttük a ciprofloxacin fragmentációs vizsgálata elektroporlasztásos körülmények között. Vizsgálatainkhoz a ciprofloxacin polietilén glikollal képzett konjugátumát (P_Cf) használtuk (25. ábra).



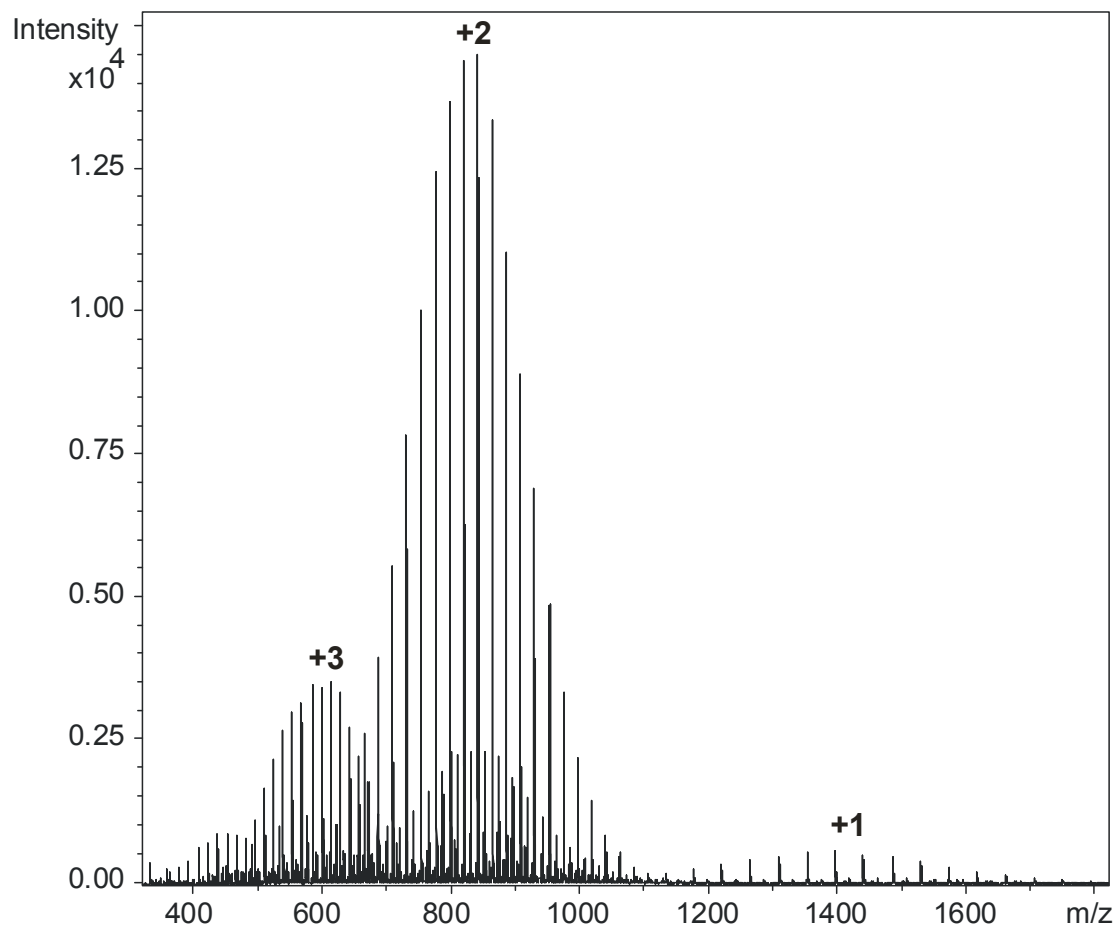
25. ábra

A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum (P_Cf) szerkezete

A P_Cf konjugátum tömegspektrometriás vizsgálata azt mutatta, hogy könnyen képez egyszeresen és többszörösen töltött adduct ionokat alkálifém kationokkal a polietilén lánc jelenlétének köszönhetően. Tömegspektrometriás szempontból fontos annak a tanulmányozása, hogy a kation, a töltés az ütközési energia, milyen módon befolyásolja a fragmentációs viselkedést.

6.1. A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum ESI-TOF MS vizsgálata

A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum (P_Cf) ESI-TOF MS vizsgálata alkálifém ionok (Li^+ , Na^+ , K^+) jelenlétében +1 - +4 töltésű adduct ionok jelenlétét mutatta (26. ábra).



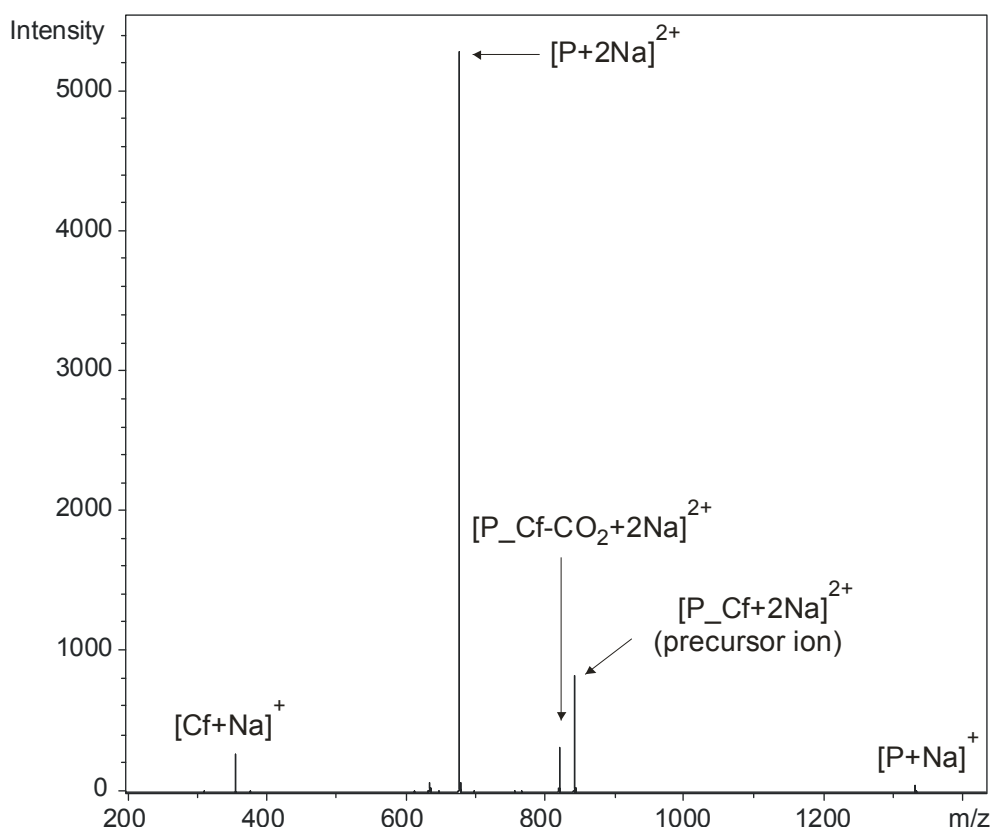
26. ábra

A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum ESI-TOF MS spektruma nátrium ionok jelenlétében

Ezen adduct ionok mellett a ciprofloxacin bázikus nitrogénjének köszönhetően protonált molekulák ($[\text{P_Cf}+\text{H}]^+$) és vegyes adduct ionok $[\text{P_Cf}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ is megjelentek a spektrumban. Hasonló spektrumokat kaptunk a P_Cf Li^+ és K^+ ionokat tartalmazó oldatának vizsgálatakor is, azonban azt találtuk, hogy a legvalószínűbb csúcshoz tartozó polimerizációfok (DP) változott a töltéssel és a kationnal.

6.2. A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum ESI-TOF MS/MS vizsgálata

A P_Cf alkálifém ionokkal kationizált adduktjának fragmentációs viselkedésének tanulmányozásához néhány oligomer csúcsot választottunk ki az MS/MS vizsgálatokhoz. Az elsődleges cél a fragmentáció függésének vizsgálata volt a kationoktól és az ütközési energiától. A $[P_Cf+2Na]^{2+}$ prekursor ion első generációs (ESI-QqTOF MS/MS) termék ion spektrumát a 27. ábrán mutatjuk be.



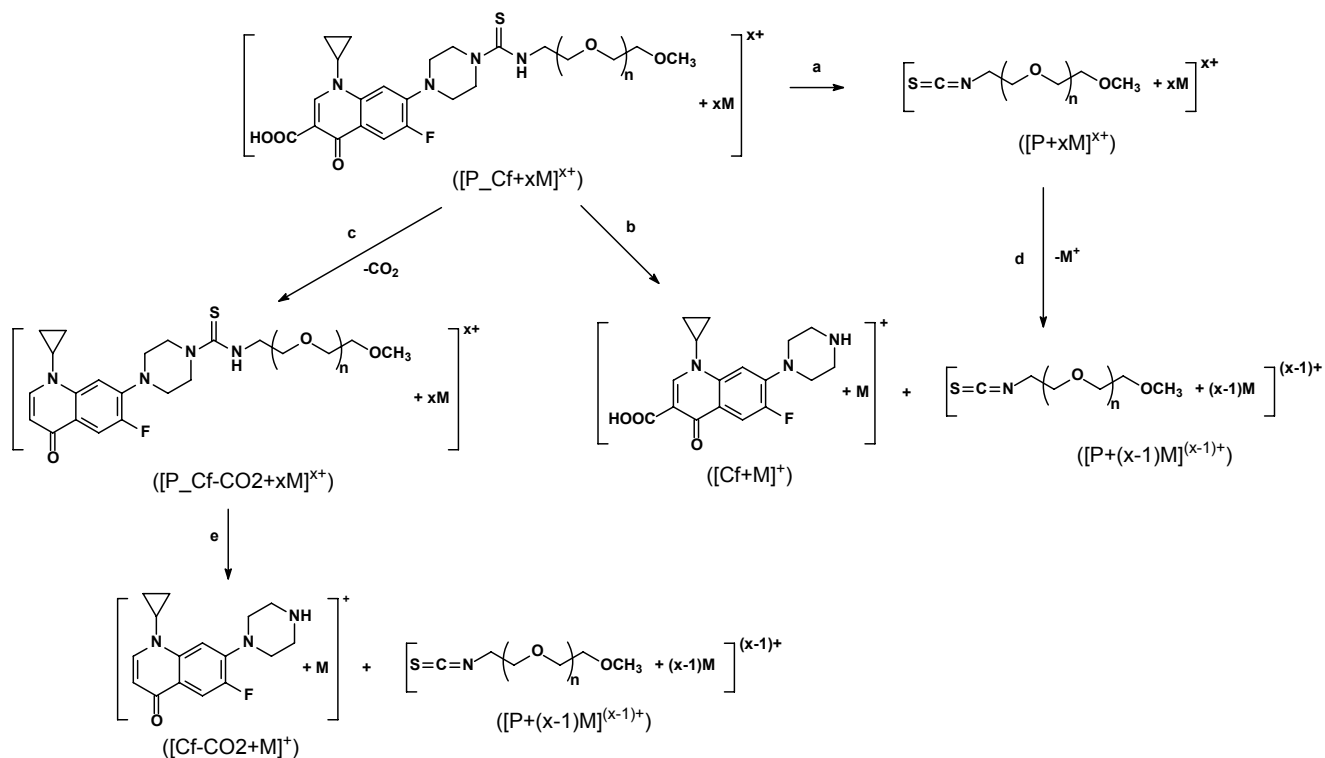
27. ábra

A kétszeresen töltött nátriummal kationizált ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum első generációs termék ion spektruma 53 eV ütközési energiánál.
(DP= 22)

A 27. ábrán látható módon a $[P_Cf + 2Na]^{2+}$ prekursor ion disszociációja a $[P + 2Na]^{2+}$ iont eredményezi egy semleges ciprofloxacin molekula eliminációja során. Ezzel párhuzamosan lejátszódik egy CO_2 molekula kilépése a prekursor ionból a $[P_Cf - CO_2 + 2Na]^{2+}$ iont eredményezve. A CO_2 molekula elvesztésével képződött termékionok csak nagyon kis intenzitással jelentek meg a spektrumban.

Az egyszerűen töltött nátriummal kationizált P_Cf ütközés indukált fragmentációja csak két termék iont eredményezett: $[P_Cf - CO_2 + Na]^+$ és $[P + Na]^+$. A $[Cf + Na]^+$ termék ion képződése egyáltalán nem figyelhető meg.

Az egyszerűen és többszörösen töltött P_Cf alkálifém ionokkal képzett addukt ionjainak javasolt főbb fragmentációs sémáit a 28. ábra foglalja össze.



28. ábra.

A ciprofloxacin-polietilén glikol konjugátum alkálifém ionokkal kationizált aduktjainak javasolt fragmentációs sémája ($M = Li, Na, K$ és $x = 2, 3$).

A 28. ábra szerint a $[P_Cf + xM]^{x+}$ prekursor ion disszociációja szimultán zajlik az **a**, **b**, és **c** folyamatok során. Az **a** folyamatban egy végcsoportvesztés történik $[P + xM]^{x+}$ termék ionok és Cf semleges fragmens képződését eredményezve. A $[P + xM]^{x+}$ további bomlása is megtörténhet az M^+ ion lehasadásával $[P + (x-1)M]^{(x-1)+}$ iont eredményezve (**d** folyamat). A **b** folyamat $[P + (x-1)M]^{(x-1)+}$ termék ionokat és $[Cf + M]^+$ -t eredményez. Az **a** és **b** folyamatokkal párhuzamosan egy CO_2 molekula eliminációja is lejátszódik a prekursor ionból (**c** folyamat), $[P_Cf - CO_2 + xM]^{x+}$ iont kapva, mely tovább bomolhat $[P_Cf - CO_2 + (x-1)M]^{(x-1)+}$ és $[Cf - CO_2 + M]^+$ ionokká. (**e** folyamat). Itt hangsúlyoznunk kell, hogy a $[P_Cf - CO_2 + (x-1)M]^{(x-1)+}$ és $[Cf - CO_2 + M]^+$ ionok csak nagyon kis intenzitással jeletkeznek a többi termékionnal összehasonlítva.

Eredményeinket összefoglalva azt tapasztaltuk, hogy a fémion nincs jelentős hatással egyszeres és kétszeres töltésű addukt ionok esetében a konjugátum fragmentációjára. A kísérleti eredmények alapján fragmentációs mechanizmust javasoltunk az egyszeres és többszörös töltésű ciprofloxacín-poli(etilén-glikol) konjugátum alkálifémekkel képzett addukt ionjaira és értelmeztük a termékionok jelintenzitásának változását az ütközési energia függvényében.

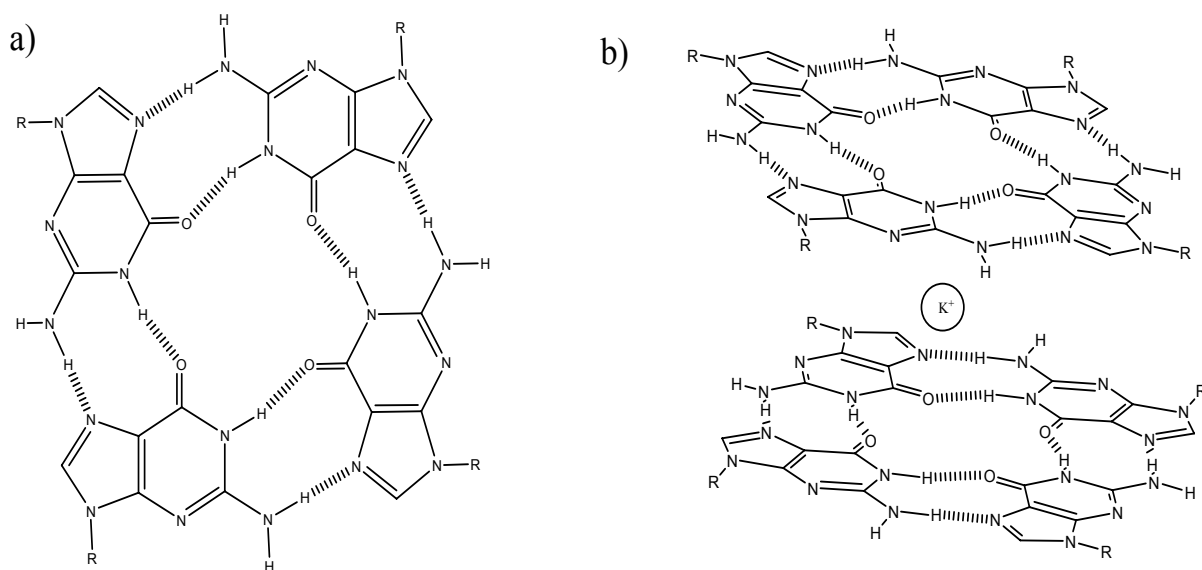
VII. Szupramolekuláris guanozin alapú polimerek előállítása

A guanozinnak olyan telekelikus származékát állítottuk elő 1500 g/mol átlagos molekulatömegű polietilénlikolból, amely nem vizes közegben (kloroform) kálium-ionok által stabilizálva dinamikus szupramolekuláris polimerrendszer kialakítására képes [10]. Az önszerveződésre jellemző karakterisztikus spektrumot kaptuk cirkuláris dikroizmus vizsgálataink során, a DOSY NMR mérések pedig azt mutatták, hogy a létrejött aggregátumok a 6-9, 20-30 és 100-400 kDa-os tömegtartományokba esnek. A fényszórás fotometria során tapasztalt bimodális eloszlás (0,1 és 1 μm átmérőjű részecskék) valamint a translációs elektronmikroszkópos felvételek szintén alátámasztották ezen szupramolekuláris polimerrendszer jelenlétét.

A G-kvartettek (G_4) önszerveződés során jönnek létre, miközben síkalkatú guanozin tetramerek képződnek Hoogsteen-típusú hidrogénkötések által (29. ábra). Ezeket az asszociátumokat gyakran stabilizálják egy központi alkálifém kation (Na^+ vagy K^+) hozzáadásával. Guanozinban gazdag részeket találtak az élő szervezetben sok helyen például a kromoszómák telomer régióiban, melyeknek fontos szerepe van a sejtosztódásban.

A telomeráz enzimek nagy koncentrációban vannak jelen tumor sejtekben és képesek újraszintetizálni ezeket a részeket, ezért fontos szerepet töltenek be a rákkutatásban. A guanozin tartalmú DNS szálak G-kvadruplex alapú szupramolekuláris szerkezeteket tartalmaznak, melyeket alkálifém stabilizál.

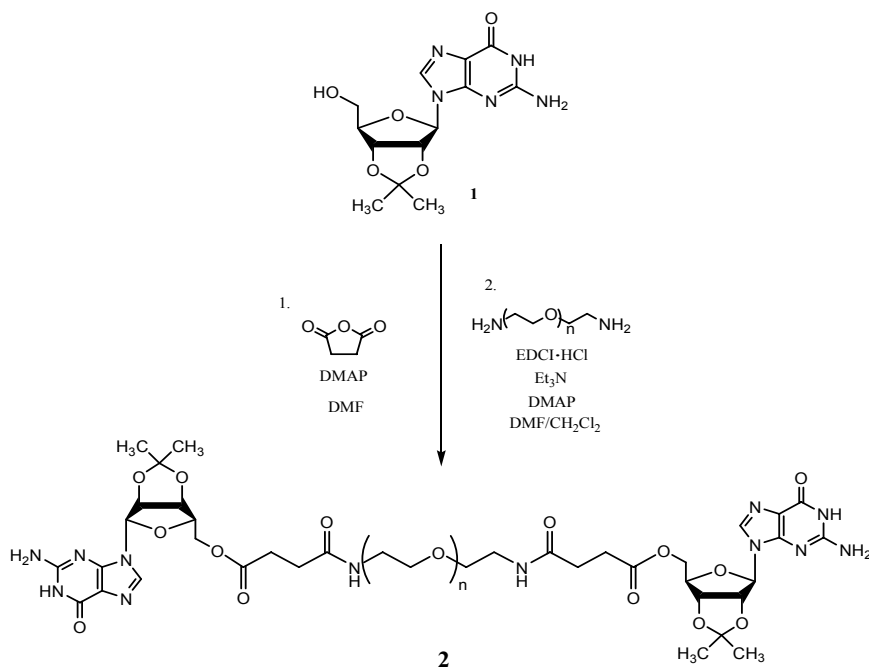
Az 1990-es évek közepén Gottarelli és Davis rávilágított, hogy nemvizes közegben a lipofil guanozin származékok kvartettekbe vagy kvadruplexekbe rendeződnek. Egy ilyen szerveződés folyamán a G_4 kation-dipólok oktamerré alakulhatnak (29. ábra b.), melyek hexadecamerré vagy oszlop alakú aggregátumokká állhatnak össze kálium ion segítségével.



29. ábra

a) A G-kvartett szerkezete. b) A [G₈] K⁺ oktamer szerkezete.

Jelen kutatás témája a szupramolekuláris polimerek kialakulásának vizsgálata volt a nemvizes közegben kialakuló kvadruplex szerkezet felhasználásával. Ennek elérésére az **1.** vegyület hemiszukcinátját kovalensen kötöttük $\alpha\omega$ -diamino-polietilén glikolhoz létrehozva a **2.** telekelikus makromonomert (30. ábra). A makromonomer szerkezetét NMR és MALDI-TOF MS mérésekkel igazoltuk.

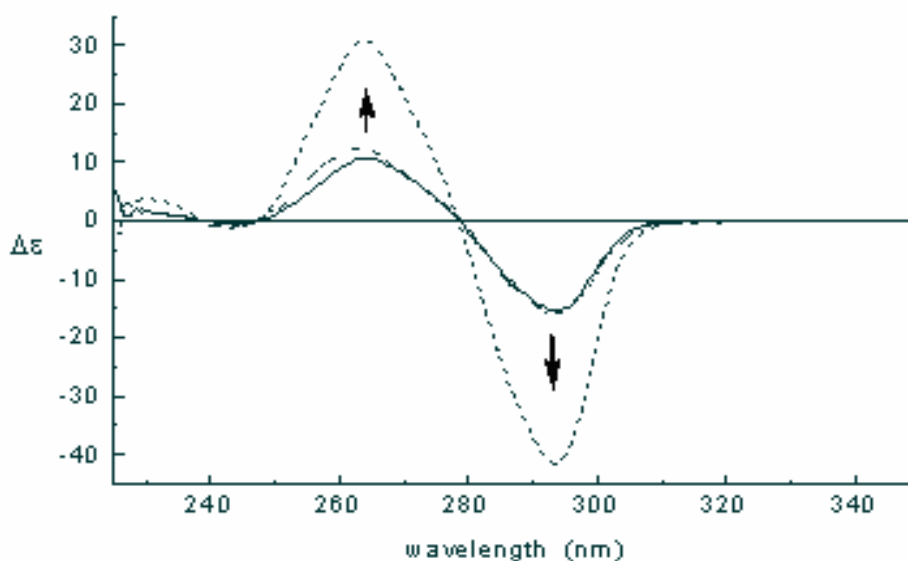


30. ábra

A szupramolekuláris makromonomer előállítása.

A Cirkuláris Dikroizmus (CD) spektroszkópiát gyakran alkalmazzák lipofil guanozin származékok önszerveződésének tanulmányozására. Egy 260 nm-nél jelentkező intenzív negatív CD csúcs, még más kromoforok jelenlétében is jellemző olyan aggregátumokra, amelyek legalább két G-kvartettből állnak egymáshoz képest királisan elforgatva. A negatív CD csúcs a hosszú tengely mentén polarizált G-kromofornak köszönhető negatív fázisa pedig balforgású hélixes elrendeződésre utal.

A 2 vegyület CD spektrumában megfigyeltük ezt a negatív fázisú jelet CHCl_3 és CH_3CN oldatban kis intenzitással K^+ ion hozzáadása nélkül is, valószínűleg a szennyezőként jelenlévő Na^+ vagy K^+ ionok miatt. A kloroformos oldat kálium pikrátos kezelése után az oldat egy intenzív negatív jelet adott, mely G-kvartettekből felépülő balforgású hélixes szerkezet kialakulását, ezáltal szupramolekuláris szerkezet megjelenését jelezte. Más lipofil G-aggregátumokkal ellentétben a pikrát anion nem szorosan kötött, mivel a 365 és 413 nm-es karakterisztikus CD átmenetek hiányoznak a spektrumból. Vízben vagy DMSO-ban nem kaptunk exciton-jelet, mivel ezen oldószerek kompetitív hidrogénkötési folyamatokban vesznek részt.

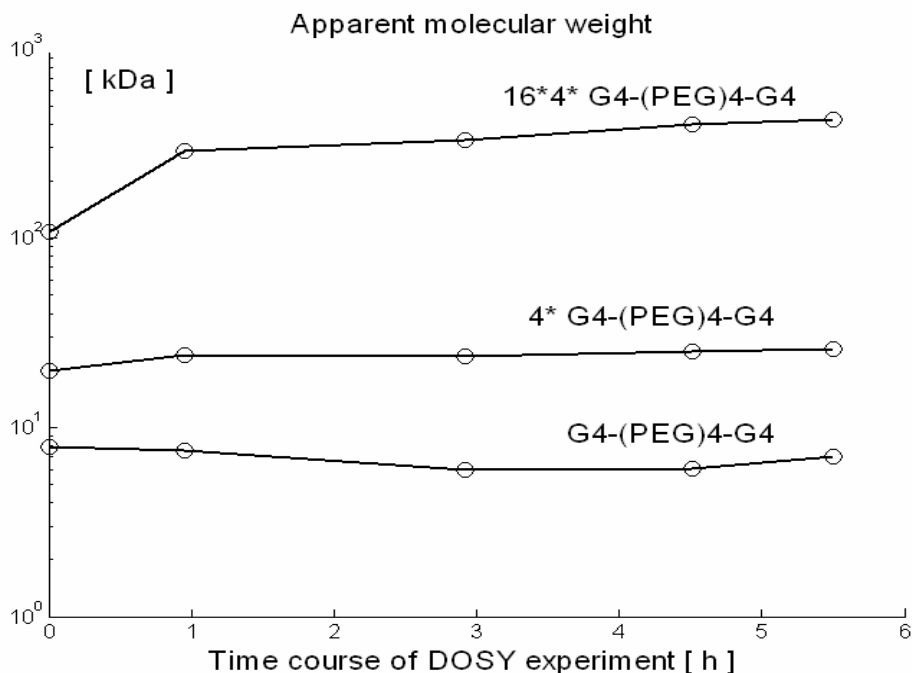


31. ábra

A 2 vegyület CD spektruma, acetonitrilben (folytonos vonal) és kloroformban (pontozott vonal) K^+ ion hozzáadása nélkül, valamint vizes kálium pikrátos extrakció után (szaggatott vonal)

A 3 vegyülethez rendelhető látszólagos molekulatömegeket DOSY NMR módszerrel határoztuk meg. Az eredmények három komponens jelenlétét mutatták oldatban: egyet a 6-9

kDa, egy másikat a 20-30 kDa, és egy harmadikat a 100-400 kDa régióban (32. ábra). A tömegarányok alapján összetételt javasoltunk a komponensekre.



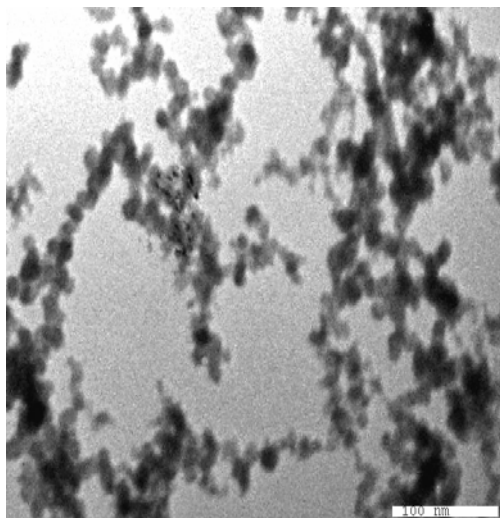
32. ábra.

A 2-ből képződött szupramolekuláris aggregátumok DOSY-val meghatározott molekulatömegei.

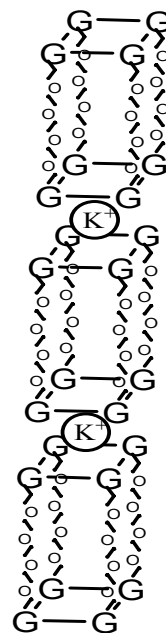
Az aggregátumok méretét dinamikus fényszórás fotometriával is alátámasztottuk. Kloroformban bimodális eloszlást találtunk 0,1 és 1 μm mérettartományban. A 2 vegyület nagyon szűk molekulatömeg eloszlásának köszönhetően a bimodális eloszlást nagy valószínűséggel nem a kiindulási vegyület polidiszperzitása okozta.

A kálium pikrátot tartalmazó minta TEM (transmissziós elektron mikroszkóp) felvétele szálszerű képződmények jelenlétét mutatta az oldószer elpárologtatása után (33. ábra). Az ismétlődő gömbszerű egységek becsült átmérője körülbelül 10nm. Azt feltételezzük, hogy ez a legkisebb szerkezet (azaz gyöngy a láncban) négy PEG láncsal összekapcsolt két G_4 kvartettel szemléltethető, ahogyan a 33. ábra b. részén is látható és ezeket a kálium ion fűzi össze láncná a G_8 komplex-képző hatás által.

a)



b)



33. ábra

a) A szupramolekuláris polimer TEM felvétele **2.** b) A $G_4-(PEG)_4-G_4$ makromonomer lehetséges szerkezete a szupramolekuláris polimerben

VIII. A zárójelentés alapjául szolgáló közlemények listája:

Angol nyelvű közlemények

1. Miklós Nagy, László Szöllősi, Sándor Kéki, Pál Herczegh, Gyula Batta, László Jicsinszky, Miklós Zsuga: Synthesis and Self-Assembly Behaviour Study of α,ω -Dicarboxyl-Poly(ethylene-glycol)-Permethyl- β -Cyclodextrin-Monoamide: A new β -cyclodextrin conjugate. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **45**, 5149 (2007) IF: 3,41
2. Miklos Nagy, László Szöllősi, Sándor Kéki, Rudolf Faust, Miklós Zsuga: Poly(vinyl alcohol)-based Amphiphilic Copolymer Aggregates as Drug Carrying Nanoparticles, *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, **41**, 331, (2009) IF: 0,72
3. László Orosz, Gyula Batta, Sándor Kéki, Miklós Nagy, György Deák, Miklós Zsuga: Self-association of bis-(α,β -glucopyranosyl)-polyisobutylene. *Carbohydr. Res.* **342**, 1323 (2007) IF: 1.67
4. Ilona Bereczki, Sándor Kéki, Pál Herczegh, Miklós Zsuga: Template effect of vancomycin aglycon in the oxidative oligomerization of 1,6-dithio-D-mannitol: A MALDI-TOF MS and solvent effect study, *Carbohydrate Polymers*, **73**, 1, (2008) IF: 1,72
5. Miklós Nagy, László Szöllősi, Sándor Kéki, Miklós Zsuga: Self Assembly Study of Polydisperse Ethylene Oxide-Based Non-Ionic Surfactants, *Langmuir* **23**, 1014 (2007) IF: 3,70
6. Sándor Kéki, Lajos Nagy, Ákos Kuki, Gábor Pintér, Pál Herczegh, Miklós Zsuga: Tandem Mass Spectrometric Study of Ciprofloxacin-Poly(ethylene glycol) Conjugate in the Presence of Alkali Metal Ions, *Int. J. Mass Spectrom.*, **275**, 104 (2008) IF: 2,34
7. Sándor Kéki, Lajos Nagy, János Török, Katalin Tóth, Albert Lévai, Miklós Zsuga: Energy-variable collision-induced dissociation study of 1,3,5-trisubstituted 2-pyrazolines by electrospray mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 1799 (2007) IF: 3,08
8. Sándor Kéki, Katalin Tóth, Miklós Zsuga, Renáta Ferenczi, Sándor Antus: (+)-Silybin a Pharmacologically Active Constituent of Silybum Marianum: Fragmentation Studies by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2255 (2007) IF: 3,08
9. Sándor Kéki: Description of Response and Charge State Distribution of Poly(ether glycol)s in Electrospray, *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **20**, 3374 (2006) IF: 3,08
10. Gábor Pintér, Gyula Batta, Pál Horváth, István Löki, Tibor Kurtán, Sándor Antus, Sándor Kéki, Miklós Zsuga, Gábor Nagy, János Aradi, Tamás Gunda, Pál Herczegh: Supramolecular Polymers Based on the Quadruplex Formation of Ditopic Guanosine Macromonomers in Nonaqueous Media. *Langmuir* **23**, 5283 (2007) IF: 3,70

Impakt faktor összes: **26,50**

A pályázat támogatásával megvalósult Ph.D. disszertációk

1. Orosz László: *Amfifilikus tulajdonságú telekelikus polimerek előállítása és karakterizálása*, Debreceni Egyetem, 2006 (Summa Cum Laude)
2. Szöllősi László Zsolt: *Önszerveződő amfifilikus oligomerek*, Debreceni Egyetem, 2008 (Summa Cum Laude)
3. Bakai-Bereczki Ilona: *Új típusú szénhidrát bázisú polimerek szintézise*, Debreceni Egyetem, 2008 (Summa Cum Laude)
4. Nagy Lajos: *Kis molekulatömegű anyagok szerkezetfelderítése lágyionizációs tömegspektrometriai módszerekkel*, Debreceni Egyetem, 2009 (Cum Laude)

Konferenciakiadványok

1. Bereczki Ilona, Kéki Sándor, Zsuga Miklós, Herczegh Pál: 1,6-Didezoxi-1,6-ditio-D-mannitol diszulfid-polimerizációjának vizsgálata, XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Románia (október 03-08.), 2006
2. Nagy Miklós, Szöllősi László, Kéki Sándor, Herczegh Pál, Batta Gyula, Zsuga Miklós: alfa,omega-Poli(etilén-glikol) permetil amino-béta-ciklodextrin konjugátum szintézise és vizsgálata, XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Románia (október 03-08.), 2006
3. Bereczki Ilona, Batta Gyula, Zsuga Miklós, Kéki Sándor, Herczegh Pál: Tioglikozidok szintézise, Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (május 11-13.), 2007
4. Kéki Sándor, Nagy Lajos, Török János, Zsuga Miklós: Poli-éterek kationizációja elektroporlasztásos körülmények között, Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (május 11-13.), 2007
5. Kunkli Zoltán, Török János, Kéki Sándor, Zsuga Judit, Gesztelyi Rudolf, Bereczki Dániel: Aszimmetrikus- és szimmetrikus-dimetil-arginin meghatározása, Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (május 11-13.), 2007
6. Nagy Lajos, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Poli(propilén-glikol) kationizációja biner-kationelegyek jelenlétében, Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (május 11-13.), 2007
7. Sándor Kéki, János Török, György Deák, Miklós Zsuga: Cooligomerization of cyclic carbonates and epsilon-caprolactone, 1st International Conference on Biodegradable Polymers and Sustainable Composites (Biopol-2007), Alicante, Spain (október 3-5.), 2007

8. Sándor Kéki, Jenő Borda, Ildikó Bodnár, Nóra Németh, Miklós Zsuga: Copolymers from lactic acid, epsilon-caprolactone, poly(ethylene oxide) and toluene diisocyanate: Novel biodegradable thermoplastics, 1st International Conference on Biodegradable Polymers and Sustainable Composites (Biopol-2007), Alicante, Spain (október 3-5.), 2007
9. Török János, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Polimerek molekulatömeg meghatározása lágyionizációs tömegspektrometriás módszerekkel, Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (május 11-13.), 2007
10. Lajos Nagy, Sándor Kéki, Ákos Kuki, Gábor Pintér, Pál Herczegh, Miklós Zsuga: Tandem mass spectrometric study of Ciprofloxacin-Poly(ethylene glycol) conjugate in the presence of alkali metal ions, International Polymer Seminar Gliwice 2008 , (25-27 June, 2008, Gliwice, Lengyelország), 2008
11. Miklós Nagy, László Szöllősi, Sándor Kéki, Rudolf Faust, Miklós Zsuga: Poly(vinyl alcohol)-based amphiphilic copolymer aggregates as drug carrying nanoparticle, J. Macromol. Sci. A (közlésre elfogadva), 2008
12. Miklós Nagy, László Szöllősy, Sándor Kéki, Pál Herczegh, Gyula Batta, László Jicsinszky, Miklós Zsuga: Synthesis and self-assembly behaviour study of alfa,omega-Dicarboxyl-Poly(ethylene glycol)-Permethyl-beta-Cyclodextrin-Monoamide: A new beta-cyclodextrin conjugate, International Polymer Seminar Gliwice 2008, (25-27 June, 2008, Gliwice, Lengyelország), 2008
13. Nagy M., Szöllősi L., Pazurik I., Kéki S., Deák Gy., Herczegh P., Batta Gy., Jicsinszky J., Zsuga M.: Amphiphilic polyethylene glycol cyclodextrin conjugates, Poranal 2008 Conf., Debrecen, 2008. augusztus 27-29., 2008
14. Szöllősi L., Nagy M., Kéki S., Faust R., Zsuga M.: Micelles from polyvinyl alcohol - polyisobutylene (PVA-PIB) block copolymers, 10th International Symposium on Particle Size Analysis, Environmental Protection and Powder Technology, 2008
15. Szöllősi L., Nagy M., Kéki S., Faust R., Zsuga M.: Micelles from polyvinyl alcohol - polyisobutylene (PVA-PIB) block copolymers, Poranal 2008 Conf., Debrecen, 2008. augusztus 27-29., 2008

Magyar nyelvű előadások

1. Bereczki Ilona, Kéki Sándor, Zsuga Miklós, Herczegh Pál: 1,6-Didezoxi-1,6-ditio-D-mannitol diszulfid-polimerizációjának vizsgálata, *XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Románia (2006. október 03-08.)*
2. Nagy Miklós, Szöllősi László, Kéki Sándor, Herczegh Pál, Batta Gyula, Zsuga Miklós: α,ω -Poli(etilén-glikol) permetil amino β ciklodextrin konjugátum szintézise és vizsgálata, *XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, Románia (2006. október 03-08.)*
3. Bereczki Ilona, Batta Gyula, Zsuga Miklós, Kéki Sándor, Herczegh Pál: Tioglikozidok szintézise, *Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)*
4. Kéki Sándor, Nagy Lajos, Török János, Zsuga Miklós: Poli-éterek kationizációja elektroporlasztásos körülmények között, *Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)*
5. Nagy Miklós, Szöllősi László, Kéki Sándor, Herczegh Pál, Batta Gyula, Zsuga Miklós: α,ω -Poli(etilén-glikol) permetil amino β ciklodextrin: szintézis és karakterizáció, *Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)*
6. Török János, Kéki Sándor, Deák György, Zsuga Miklós: Polimerek molekulatömeg meghatározása lágyionizációs tömegspektrometriás módszerekkel, *Zilele Academice Aradene, Arad, Románia (2007. május 11-13.)*
7. Nagy Lajos, Kéki Sándor, Pintér Gábor, Herczegh Pál, Zsuga Miklós: Ciprofloxacín-poli(etilén-glikol) konjugátum tanulmányozása tandem tömegspektrometriával különböző alkálifém ionok jelenlétében, *XIV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár, Románia (2008. november 13 – 15.)*